Vasopressin

^{125}I RIA Kit

For the quantitative determination of
human arginine vasopressin (AVP, ADH)

Instruction Manual
Manuel d'Instructions
Testanleitung
Manuale di Istruzioni

Catalog No./REF./KAT.-NR./Numero di Catalogo: 23065

DiaSorin

Stillwater, Minnesota 55082-0285, U.S.A.

TABLE OF CONTENTS

VASOPRESSIN RADIOIMMUNOASSAY

1. INTENDED USE

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE

This kit is intended for the quantitative determination of human arginine vasopressin (AVP, ADH) in plasma or other samples by radioimmunoassay (RIA) following an extraction using ODS-silica.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Arginine vasopressin (AVP) is a cyclic nine amino acid peptide. The structure of AVP is very similar to that of oxytocin differing in only two amino acids. Due to its powerful antidiuretic actions, vasopressin is also known as the antidiuretic hormone (ADH). Basically, AVP acts on the collecting tubule of the kidney, causing an increase in permeability to water and urea but not to larger molecules. AVP also possesses neurotransmitter functions, as well as releasing factor and peripheral humoral functions.[1]

For many years, it has been known that AVP is produced in two locations in the hypothalamus, the supraoptic and the paraventricular nuclei.

AVP is transported from the supraoptic nucleus, via axons, through the neurohypo-physeal tract, to the posterior pituitary, where the axons end as terminal buttons on capillaries. It is from this region that secretion of AVP into peripheral circulation occurs, possibly in association with protein carrying molecules known as neurophysin.[2-4]

It seems likely that AVP from the paraventricular nucleus is secreted into capillaries of the hypothalamic hypophyseal portal system and conducted to the anterior pituitary where it may stimulate adrenocorticotropin (ACTH) release.

It is known that a number of both osmotic and non-osmotic stimuli will cause AVP release. A negative feedback system, which includes the kidney, central nervous system and thirst mechanism, exists and allows for regulation of body fluid concentration. AVP release is also influenced by a number of other factors including: emotional stress, posture, blood volume, temperature, and many pharmacological agents. Alcohol appears to weakly inhibit AVP secretion.[5-7]

The AVP assay is utilized in studies involving diabetes insipidus, syndrome of inappropriate ADH secretion (SIADH), syndrome of ectopic AVP production, and psychogenic water intoxication.[5, 8]

AVP RIA is very useful in separating central diabetes insipidus from nephrogenic diabetes insipidus. Central diabetes insipidus, which is marked by excessive thirst (polydipsia) and the passage of large amounts of dilute urine (polyuria), is caused by inadequate AVP production. Central diabetes insipidus can be either familial or idiopathic and can affect both males and females at any age. In contrast, nephrogenic diabetes insipidus is caused by failure of the renal tubules to respond to vasopressin, rendering the tubules unable to reabsorb water.

Nephrogenic diabetes insipidus, which is hereditary, generally affects males, and normally

occurs at infancy, is characterized by normal circulating AVP levels.[4, 9, 10]

SIADH refers to a release of vasopressin that is inappropriate to a low serum osmolality.[11, 5] It can be caused by a number of conditions including: pulmonary disease, head trauma (injury or surgical), local infection, and cancer. Certain neoplasms (especially bronchogenic carcinoma) produce AVP or AVP-like peptides. This ectopic vasopressin production syndrome is generally characterized by a sustained high elevation of AVP levels.[12]

Psychogenic water intoxication is caused by compulsive and excessive water consumption. It is not the result of a physical disorder; rather, as its name indicates, psychogenic water intoxication is a behavioral disturbance.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The DiaSorin AVP RIA consists of 2 procedures. The first involves extraction of the samples using the octadecasilyl-silica (ODS-silica) columns that are included in the kit. The extracted samples are then assayed using a disequilibrium RIA procedure to maximize sensitivity. There is a pre-incubation of sample and first antibody for 18 - 24 hours at 2-8°C; tracer is then added followed by a second incubation at 2-8°C. Phase separation is completed in 15-25 minutes at 20-25°C with a pre-precipitated complex of second antibody, carrier and PEG added in a single pipetting step.

4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

Vasopressin 1% BSA-borate Buffer	1 vial/35 mL
Vasopressin Calibrator	1 vial/2.0 mL
Vasopressin Antiserum	1 vial/7 mL
^{125}I Vasopressin	1 vial/7 mL
Precipitating Complex (GAGP-PPT)	1 vial/ 35 mL
Vasopressin Control Plasma	2 vials/2.5 mL
Number of tests	65

STORAGE: Upon receipt, and prior to reconstitution, store all reagents at 2-8°C. After reconstitution, store all reagents at -15° or lower until the expiration date on the label. Reagents should not be used past the expiration date.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming. Reagents from different batches must not be mixed.

4.1 Vasopressin 1% BSA-borate Buffer: lyophilized reagent

1% BSA-borate buffer contains thimerosal as a preservative. Reconstitute the vial with 35 mL of purified water and allow it to stand for 15-20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.2 Arginine Vasopressin Calibrator: lyophilized reagent

Purified arginine vasopressin, at a nominal concentration of 80 pg/mL, is made in BSA-borate buffer containing thimerosal. Exact values are assigned with each lot.

Reconstitute the vial with 2.0 mL of purified water, mix and allow it to stand for 15-20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using. In order to obtain the entire calibrator curve, make serial dilutions by adding 500 µL of calibrator to 500 µL of 1% BSA-borate to give calibrators of 40, 20, 10, and 5 pg/mL. (These values will vary according to the exact concentration of the calibrator lot.)

Add 500 µL of 80 pg/mL calibrator to 500 µL of 1% BSA-borate and mix to give 40 pg/mL.

Add 500 µL of 40 pg/mL calibrator to 500 µL of 1% BSA-borate and mix to give 20 pg/mL.

Add 500 µL of 20 pg/mL calibrator to 500 µL of 1% BSA-borate and mix to give 10 pg/mL.

Add 500 µL of 10 pg/mL calibrator to 500 µL of 1% BSA-borate and mix to give 5 pg/mL.

The DiaSorin vasopressin calibrator has been calibrated against the World Health Organization (WHO) preparation 77/501. Any comparison of sensitivity with other products or procedures should be done with this reference standard. The calibrator demonstrates commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this *in vitro* diagnostic test as recommended.

4.3 Vasopressin Antiserum: lyophilized reagent

Guinea pig anti-vasopressin serum is diluted in BSA-borate buffer containing thimerosal. Reconstitute the vial with 7 mL of purified water and allow it to stand for 15 - 20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.4 ^{125}I Vasopressin: lyophilized reagent

(Lys^{8}) Vasopressin is labeled with iodine-125 and diluted in BSA-borate-EDTA buffer containing thimerosal. Reconstitute the vial with 7 mL of purified water and allow it to stand for 15 -20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.5 Precipitating Complex (GAGP-PPT): lyophilized reagent

Normal guinea pig serum, pre-precipitated with goat anti-guinea pig serum and polyethylene glycol (PEG), is diluted in BSA-borate buffer with preservatives added. Reconstitute the vial with 35 mL of purified water; mix thoroughly until the suspension appears homogeneous and then allow it to stand for a minimum of 30 minutes at room temperature with occasional mixing.

4.6 Vasopressin Control Plasma: lyophilized reagent

Human plasma is spiked, if necessary, with the appropriate amount of arginine vasopressin to obtain a concentration within a specified range. Sodium azide is added as a preservative. Reconstitute each vial with 2.5 mL of purified water and allow them to stand for 15-20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly and treat the quality control plasma as an unknown sample.

4.7 ODS-Silica: lyophilized reagent

Octadecasilyl-silica is enclosed in plastic columns (Sep-Paks). The ODS-silica columns included in the kit must be "primed" prior to applying sample (see Procedure section). The columns may be stored at room temperature.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

Not for internal or external use in humans or animals

REAGENTS CONTAINING HUMAN SOURCE MATERIAL

Treat as potentially infectious.

Each serum/plasma donor unit used in the preparation of this product has been tested by a U.S. FDA approved method and found non-reactive for the presence of HBsAg, antibody to HCV, and antibody to HIV 1/2. While these methods are highly accurate, they do not guarantee that all infected units will be detected. This product may also contain other human source material for which there is no approved test. Because no known test method can offer complete assurance that hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV), or other infectious agents are absent, all products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions as described in the U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4th ed., May 1999 or current edition.

REAGENTS CONTAINING SODIUM AZIDE

CAUTION: Some reagents in this kit contain sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. For further information, refer to "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

REAGENTS CONTAINING THIMEROSAL

Some reagents in this kit contain thimerosal which contains a mercury compound. Disposal of elemental mercury, inorganic mercury, mercury oxides, and mercury compounds should be done in strict compliance with all local, state, and federal regulations.

WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

REAGENTS CONTAINING IODINE-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 1 µCi (37 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use, and transfer, are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer, and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

6. INDICATIONS OF POSSIBLE DETERIORATION OF KIT REAGENT

6.1 The presence of abnormal particulate matter in any of the reagents.

6.2 A shift in the slope or position of the calibrator curve from what is normally obtained.

6.3 A decrease in maximum binding.

6.4 A high nonspecific binding.

7. COLLECTION AND PREPARATION OF SPECIMEN

Two milliliters of EDTA plasma are required for the extraction in this procedure.

Collect blood by venipuncture in a 5 or 10 mL evacuated glass tube. EDTA (7.2 mg/5 mL blood) is used as an anticoagulant. Centrifuge promptly for 15 minutes using 760 x g.* Separate the plasma from the cells and place in storage tubes. Vasopressin has been demonstrated to be stable at room temperature for several hours. For prolonged storage, freeze at -15°C or lower. All plastics, glassware, or other materials coming into contact with the specimen should be entirely free of any contamination.

NOTE: It has been observed that lower recoveries may be obtained when using heparinized plasma or serum. In addition, heparinized plasma will occasionally plug the Sep-Pak column.

8. EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

8.1 Disposable borosilicate glass tubes, 12 x 75 mm.

8.2 Centrifuge to accommodate 12 x 75 mm tubes, temperature controlled.

8.3 Gamma scintillation counter capable of counting iodine-125.

8.4 Vortex.

8.5 Pipetting devices:

- **a.** Micropipettors calibrated to deliver 100 µL and 200 µL.
- **b.** Repeating dispensers calibrated to deliver 100 µL and 500 µL.

8.6 12 mL disposable syringes.

8.7 Methanol, reagent grade or better.

8.8 4% acetic acid.

8.9 1 M hydrochloric acid.

8.10 Compressed air or nitrogen supply.

8.11 37°C water bath.

8.12 Disposable glass tubes, 16 x 100 mm.

8.13 Purified water

9. EXTRACTION OF PLASMA WITH ODS-SILICA COLUMNS

9.1 Attach each Sep-Pak to a syringe hub.

9.2 Add 5 mL of methanol to each syringe.

9.3 Press through the syringe using the syringe plunger.

9.4 Remove the Sep-Paks.*

9.5 Remove the syringe plunger from the syringes.

9.6 Replace the Sep-Paks on syringes.

9.7 Add 10 mL of purified water to each syringe.

* g = (1118 x 10^{-8}) (radius in cm) $(rpm)^2$

9.8 Repeat steps 9.3 through 9.6.

9.9 Repeat step 9.7, then steps 9.3 through 9.6.

9.10 Acidify 2 mL of EDTA plasma or control plasma with 200 µL of 1 M HCI. The pH should be 3 - 4. Load the sample in the syringe and push slowly, over a period of one minute, through the column.

9.11 Repeat steps 9.4 through 9.6.

9.12 Rinse the column with 20 mL of 4% acetic acid.

9.13 Repeat steps 9.3 through 9.6.

9.14 Collect the eluate in 16 x 100 mm tubes by eluting the peptide with 3 mL of methanol. Push slowly so that the methanol remains in contact with the ODS-silica for a minimum of 3 minutes.

9.15 Repeat steps 9.4 through 9.6.

9.16 Put through another 1 mL of methanol to ensure complete elution.

9.17 Evaporate the methanol eluate to dryness in a 37°C water bath using an air jet (compressed air) or nitrogen. Specimens must be completely dry. Do not leave in the 37°C water bath longer than required to dry.

9.18 Reconstitute the sample with 0.5 mL of 1% BSA-borate buffer. (A sample that is expected to be elevated can be diluted with more 1% BSA-borate at this step). Vortex and place at 37°C for ten minutes to ensure reconstitution of the dried sample. Vortex after incubation.

9.19 Assay 200 µL in duplicate in the radioimmunoassay.

10. ASSAY PROCEDURE

10.1 Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen reagents to thaw completely. Do not allow reagents to reach temperatures greater than 20-25°C. Mix all reagents gently before using.

10.2 Set up labeled 12 x 75 mm disposable tubes in duplicate according to the Scheme of the Assay, on the back page.

10.3 Add reagents as follows:

- **a. Total count tubes**
  Set aside until step 5
- **b. Nonspecific binding tubes (NSB)**
  200 µL of 1% BSA-borate
- **c. Calibrator 0**
  200 µL of 1% BSA-borate
  100 µL of vasopressin antiserum

* Remove the Sep-Pak from the end of the syringe before removing the plunger to avoid contaminating the syringe contents with the fluid in the Sep-Pak.

d. Calibrators
200 µL of vasopressin calibrator
100 µL of vasopressin antiserum

e. Extracted control and unknown samples
200 µL of extract
100 µL of vasopressin antiserum

10.4 Vortex the tubes gently without foaming and incubate for 18-24 hours at 2-8°C.

10.5 Add 100 µL of ^{125}I vasopressin to all tubes.

10.6 Vortex the tubes gently without foaming and incubate for 18-24 hours at 2-8°C.

10.7 Vigorously mix the GAGP-PPT and add 500 µL to all the tubes except the total count tubes.

10.8 Vortex the tubes gently without foaming and incubate for 15-25 minutes at 20-25°C.

10.9 Centrifuge the tubes for 20 minutes using 760 x g* at 20-25°C.

10.10 Immediately decant the supernatant from all the tubes except the total count tubes by inverting them for a minimum time of 2 minutes. Blot the tubes with absorbent paper to remove any drops of supernatant that may be remaining on the tubes before turning the tubes upright.

10.11 Using a gamma scintillation counter, count the precipitate of each tube and the total count tubes for a sufficient time to achieve statistical accuracy. (See Limitations of the Procedure section.)

11. PROCEDURAL COMMENTS

11.1 Assay all samples in duplicate to ensure confidence in values obtained.

11.2 Add each aliquot of reagent to the lower third of the assay tube to ensure complete mixture of reagents.

11.3 Some manufacturers' disposable borosilicate glass tubes yield elevated nonspecific bindings.

11.4 If you choose to aspirate the supernatant from the precipitate, be careful not to disturb the precipitate.

11.5 To completely monitor the consistent performance of an RIA there are additional factors which may be checked. DiaSorin suggests a check of the following parameters to assure consistent kit performance.

a. Total Counts

b. Maximum Binding

Average counts per minute (CPM) of Calibrator 0 Tube / Average CPM of Total Count Tubes.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (radius in cm) $(rpm)^2$

c. Nonspecific Binding
Average CPM of NSB Tube / Average CPM of Total Count Tubes.

d. Slope of Calibrator Curve
For example, monitor the 80, 50, and 20% suppression points of the calibrator line.

12. QUALITY CONTROL

Each laboratory should include at least two control samples in every assay to ensure the validity of each assay's results. A mean and standard deviation should then be determined for each control using a minimum of ten assays. An acceptable range of values may then be obtained for these controls using ±2 standard deviations of the values previously determined. The DiaSorin Quality Control Laboratory has determined a range for the control included with this kit. The range is printed on the control vial.

13. CALCULATION OF RESULTS

There are many methods in existence for calculating results of RIAs. Each is based on obtaining a calibration curve by plotting the extent of binding against stated concentrations of the calibration calibrators. This graph may be neither linear or logarithmic scale. Each of these methods gives essentially the same values for controls and samples, although certain assays may "fit" better into one particular method versus another. The calculation method for the DiaSorin quality control laboratory is % B/B_0 versus log concentration.

13.1 Calculate the average CPM for each calibrator, control and unknown sample.

13.2 Subtract the average CPM of the NSB tubes from all counts.

13.3 Divide the corrected CPM of each calibrator, control or unknown sample by the corrected CPM of the Calibrator 0.

$$B/B_0\ (\%) = \frac{\text{CPM of Calibrator or Unknown Sample} - \text{CPM of NSB}}{\text{CPM of Calibrator 0} - \text{CPM of NSB}} \times 100$$

13.4 Using two cycle semi-log or log-logit graph paper, plot percent B/B_0 for the vasopressin calibrators (vertical axis) versus the concentration (horizontal axis).

13.5 Draw a best-fit line through the points.

13.6 Interpolate the levels of vasopressin in the unknown samples from the plot.

13.7 Calculate the vasopressin value appropriately. For example: if 2 mL of plasma was extracted and reconstituted to 0.5 mL, divide by four; if 2 mL of plasma was extracted and reconstituted to 1.0 mL, divide by two.

13.8 If any sample reads greater than the highest calibrator it should be re-extracted with a lesser volume of plasma and/or reconstituted with more volume of 1% BSA borate.

13.9 If any extract should remain, it could also be diluted further and reassayed.

13.10 Calculate maximum binding by dividing CPM of Calibrator 0 by the average total counts obtained in the total count tubes.

TABLE II

DiaSorin Vasopressin RIA Sample Data

Tube	Duplicate CPM	Average CPM	Corrected CPM	Percent Bound (B/T)	Percent (B/B_0)	Graph Conc. (pg/mL)	Final Conc. (pg/mL)
Total Count	5,841	5,917					
	5,992						
NSB	192	199		3.4			
	205						
Calibrator 0	2,970	2,872	2,673	48.5	100		
	2,774						
Calibrators (pg/mL)							
A(5)	2,537	2,566	2,367		88.6		
	2,595						
B(10)	2,374	2,324	2,125		79.5		
	2,274						
C(20)	1,772	1,779	1,580		59.1		
	1,785						
D(40)	1,200	1,234	1,035		38.7		
	1,268						
E(80)	819	819	620		23.2		
	818						
Unknown Samples							
1	2,591	2,556	2,357		88.2	5.5	1.4
		2,521					
2	1,265	1,297	1,098		41.1	36.5	9.1
	1,329						

Typical sample data and a calibrator curve are shown in TABLE II and FIGURE 1; this information is for reference only and should not be used for the calculation of any value.

VASOPRESSIN SAMPLE CALIBRATOR CURVE

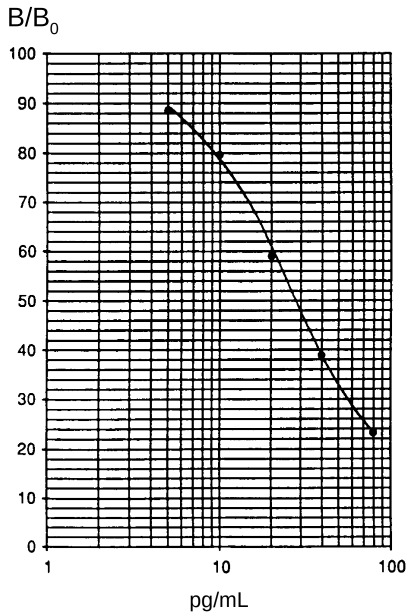


FIGURE 1

Reduction Data

The DiaSorin QC lab uses a smoothed spline curve fit.

14. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

14.1 Care must be taken so that all samples are extracted uniformly.

14.2 Counting times should be sufficient to prevent the introduction of statistical error in counting (for example, accumulation of 2,000 CPM will yield 5% error; 10,000 CPM will yield 1% error).

15. EXPECTED VALUES

Normal Range

Each laboratory should establish its own normal range. In male and female specimens (n = 27), DiaSorin determined the mean vasopressin value to be 1.4 pg/mL, with a normal range of ND-4.7 pg/mL. Normal values were calculated by extracting 2 mL of EDTA plasma. The final answers were divided by four to give the normal range of ND-4.7 pg/mL. The extraction and concentration step allows reporting of values that would otherwise be less than the sensitivity of the assay.

The values obtained by DiaSorin are consistent with those found by other researchers.

In a study using thirty-one normal subjects, the normal range of plasma vasopressin was determined to be 1.4 ±1.0 pg/mL.[1]

16. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

16.1 Precision

Intra Assay Variation (values = pg/mL)

Sample Number	Mean Value	S.D	%C.V.
Low	4.9	0.54	11.2
Medium	22.7	1.38	6.1
High	41.5	2.25	5.4

Inter Assay Variation (values = pg/mL)

Sample Number	Mean Value	S.D	%C.V.
Low	5.0	0.14	2.8
High	40	1.78	4.4

16.2 Trueness: The assay truness has been verified by the dilution test and the recovery test.

Linearity (Parallelism)

SERIAL DILUTION STUDY OF THREE PATIENT SAMPLES (VALUES = PG/ML)

Sample Number	Undiluted	1/2	1/4
1	5.4	5.5	4.7
2	9.3	8.9	9.0
3	3.5	3.1	2.8

Recovery (Accuracy) (Values = pg/mL)

Background	Calibrator Added	Expected Value	Measured Value	Percent Recovery
Set No. 1				
2.2	3.0	5.2	4.8	92
2.2	5.0	7.2	6.3	88
2.2	10	12.2	11	90
Set No. 2				
1.9	3.0	4.9	5.0	102
1.9	10	11.9	10.1	85
1.9	20	21.9	20.3	93

16.3 Analytical Sensitivity

When defined as the apparent concentration at 3 standard deviations from the counts at maximum binding, the minimum detectable amount is 2.5 pg/mL. Any patient sample that reads less than 2.5 pg/mL before correcting for the dilution factor, cannot be distinguished from zero.

16.4 Analytical Specificity

Comparison of the reactivity of the vasopressin antibody was made with the following peptides:

Peptide	% Cross-reactivity
Arginine vasopressin	100
Lysine vasopressin	600
Oxytocin	<0.01
Vasotocin	0.14

SEE LAST PAGE FOR REFERENCES

SCHEME OF THE ASSAY

1. Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen specimens to thaw completely. Do not allow reagents to reach above 25°C. Identify tubes in duplicate.

2. Extract controls and unknows according section nine.

3. Dispense reagents according to the following scheme.

Tubes/Reagents	Total Counts	NSB	Cal 0	Cal 1-5	Controls and unknown samples
1% BSA-borate Buffer	-	200 µl	200 µL	-	-
Calibrators (1-5)	-	-	-	200 µL	-
Extracted Controls	-	-	-	-	200 µL
Extracted Unknown Samples	-	-	-	-	200 µL
Antiserum	-	-	100 µL	100 µL	100 µL

4. Cover the tubes with parafilm and vortex gently.

5. Incubate for 18–24 hours at 2-8°C.

6. Dispense 100 µL of the tracer into all wells.

7. Cover and vortex gently.

8. Incubate for 18-24 hours at 2-8°C.

9. Dispense 500 µL of the GAGP-PPT into all wells except the total count tubes.

10. Incubate for 15-25 minutes at 20-25°C.

11. Centrifuge using 760 x g* for 20 minutes.

12. Decant the supernatants.

13. Count each tube in a gamma counter for 60 seconds or longer.

*g = (1118 x 10^{-8}) (radius in cm) $(rpm)^2$

DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DE LA VASOPRESSINE

1. INDICATION

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*

Cette trousse permet la détermination quantitative de l'arginine-vasopressine humaine (AVP, ADH) dans le plasma ou d'autres échantillons par dosage radio-immunologique (RIA) à la suite d'une extraction au silice octadécylsilylé.

2. RÉSUMÉ ET COMMENTAIRE

L'arginine-vasopressine (AVP) est un peptide cyclique formé de neuf acides aminés. Sa structure est très similaire à celle de l'ocytocine, la seule différence résidant dans deux acides aminés. De par ses propriétés antidiurétiques puissantes, la vasopressine est également connue sous le nom d'hormone antidiurétique (ADH). Concrètement, l'AVP agit sur le tube collecteur du rein, entraînant une augmentation de sa perméabilité à l'eau et à l'urée, mais pas à des molécules plus grosses. L'AVP agit également comme neurotransmetteur et facteur de déclenchement et possède des fonctions humorales périphériques.[1]

On sait, depuis de nombreuses années, que l'AVP est produite dans deux zones de l'hypothalamus, les noyaux supra-optique et paraventriculaire.

Elle est transportée depuis le noyau supra-optique, le long des axones et par le faisceau neurohypophysaire,vers la neurohypophyse où les axones se terminent par des boutons synaptiques sur les capillaires. C'est de là que l'AVP est sécrétée dans la circulation périphérique : elle est probablement associée à des molécules porteuses de protéines appelées neurophysines.[2-4]

L'AVP issue du noyau paraventriculaire est vraisemblablement sécrétée dans les capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire avant d'être conduite à l'antéhypophyse où elle peut stimuler la libération de corticotrophine (ACTH).

Un certain nombre de stimuli osmotiques et non osmotiques sont connus pour provoquer la sécrétion d'AVP. Un système de rétrocontrôle négatif, comprenant le rein, le système nerveux central et le mécanisme de la soif, régule la concentration des liquides organiques. La libération d'AVP est également influencée par un certain nombre de facteurs supplémentaires : stress émotionnel, posture, volémie, température et de nombreux agents pharmacologiques. L'alcool semble légèrement inhiber la sécrétion d'AVP.[5-7]

Le dosage de l'AVP est utilisé lors d'études concernant le diabète insipide, le syndrome d'antidiurèse inappropriée (SIADH), le syndrome de sécrétion ectopique d'AVP et l'intoxication psychogène par l'eau.[5, 8]

Le dosage radio-immunologique de l'AVP permet de distinguer le diabète insipide central du diabète insipide néphrogénique. Le diabète insipide central, caractérisé par une soif excessive (polydipsie) et le passage de grandes quantités d'urine diluée (polyurie), est dû à une sécrétion d'AVP inadéquate. Familial ou idiopathique, il peut toucher les hommes comme les femmes à tout âge. En revanche, le diabète insipide néphrogénique est dû à une absence de réponse des tubes urinifères à la vasopressine, ce qui les rend incapables de réabsorber l'eau.

Ce diabète, qui est héréditaire, touche généralement les hommes pendant leur petite enfance. Il se caractérise par des taux normaux d'AVP en circulation.[4, 9, 10]

Le SIADH correspond à une sécrétion de vasopressine qui ne convient pas à une faible pression osmotique du sérum.[11, 5] Il peut avoir un certain nombre de conditions pour origine : affection pulmonaire, traumatisme crânien (accidentel ou chirurgical), infection locale et cancer. Certains néoplasmes (surtout le carcinome bronchogénique) produisent de l'AVP ou des peptides mimétiques de l'AVP. Ce syndrome de sécrétion ectopique de la vasopressine est généralement caractérisé par une élévation significative et prolongée des taux d'AVP.[12]

L'intoxication hydrique psychogène est due à une consommation compulsive et excessive d'eau. Il ne s'agit pas d'un trouble physique mais, comme son nom l'indique, d'un trouble du comportement.

3. DESCRIPTION DE LA METHODE DE DOSAGE

Le dosage radio-immunologique de l'AVP conçu par DiaSorin se compose de 2 procédures. La première implique l'extraction des échantillons sur des colonnes de silice octadécylsilylé (silice ODS) qui sont fournies dans la trousse. Les échantillons extraits sont ensuite dosés à l'aide d'un RIA de déséquilibrage afin d'optimiser la sensibilité. L'échantillon et le premier anticorps sont mis en préincubation pendant 18 à 24 heures entre 2 et 8° C. Le traceur est ensuite ajouté avant une deuxième incubation entre 2 et 8° C. La séparation en phases s'accomplit en15 à 25 minutes entre 20 et 25° C avec l'ajout en une seule phase de pipetage d'un complexe préalablement précipité contenant le deuxième anticorps, le vecteur et du PEG.

4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Tampon vasopressine de BSA-borate à 1 %	1 tube/35 ml
Étalon vasopressine	1 tube/2,0 ml
Antisérum vasopressine	1 tube/7 ml
vasopressine ^{125}I	1 tube/7 ml
Complexe précipitant (GAGP-PPT)	1 flacon/35 ml
Plasma de contrôle vasopressine	2 tubes/2,5 ml
Nombre de dosages	65

CONSERVATION : Dès réception, et avant reconstitution, tous les réactifs doivent être stockés entre 2 et 8°C. Après reconstitution, stocker tous les réactifs à une température inférieure ou égale à -15° C jusqu'à la date de péremption sur l'étiquette. Les réactifs ne

doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption.

Pendant la reconstitution du contenu des tubes, agiter délicatement pour éviter la formation de mousse. Les réactifs de lots différents ne doivent pas être mélangés.

4.1 Tampon vasopressine BSA-borate à 1 % : réactif lyophilisé

Le tampon BSA-borate à 1 % contient du thiomersal comme conservateur. Reconstituer le flacon avec 35 ml d'eau purifiée et laisser reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu. Bien mélanger avant utilisation.

4.2 Étalon arginine-vasopressine : réactif lyophilisé

L'arginine-vasopressine purifiée, à une concentration nominale de 80 pg/ml, est diluée dans le tampon BSA-borate contenant du thiomersal. Les valeurs exactes de ces concentrations sont fournies avec chaque lot.

Reconstituer le flacon avec 2,0 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu. Bien mélanger avant utilisation. Afin d'obtenir la courbe d'étalonnage complète, effectuer des dilutions en série en ajoutant 500 µl d'étalon à 500 µl de BSA-borate à 1 % et créer ainsi des étalons de 40, 20, 10 et 5 pg/ml. (Ces valeurs varient en fonction de la concentration exacte du lot d'étalons.)

Ajouter 500 µl d'étalon à 80 pg/ml à 500 µl de BSA-borate à 1 % et mélanger pour obtenir 40 pg/ml.

Ajouter 500 µl d'étalon à 40 pg/ml à 500 µl de BSA-borate à 1 % et mélanger pour obtenir 20 pg/ml.

Ajouter 500 µl d'étalon à 20 pg/ml à 500 µl de BSA-borate à 1 % et mélanger pour obtenir 10 pg/ml.

Ajouter 500 µl d'étalon à 10 pg/ml à 500 µl de BSA-borate à 1 % et mélanger pour obtenir 5 pg/ml.

L'étalon vasopressine de DiaSorin a été calibré selon la préparation 77/501 de l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Toute comparaison de sensibilité avec d'autres produits ou procédures de dosage doit être effectuée selon ce standard de référence. L'étalon démontre sa commutabilité avec les échantillons des patients lorsqu'il est utilisé avec les réactifs et selon le mode d'emploi de ce dosage diagnostique *in vitro*, comme recommandé.

4.3 Antisérum vasopressine : réactif lyophilisé

Du sérum anti-vasopressine de cochon d'Inde est dilué dans le tampon BSA-borate contenant du thiomersal. Reconstituer le flacon avec 7 ml d'eau purifiée et laisser reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu. Bien mélanger avant utilisation.

4.4 Vasopressine^{125}I : réactif lyophilisé

La (lysine^{8}-)vasopressine est marquée à l'iode 125 et diluée dans un tampon BSA-borate-EDTA qui contient du thiomersal. Reconstituer le flacon avec 7 ml d'eau purifiée et laisser reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu. Bien mélanger avant utilisation.

4.5 Complexe précipitant (GAGP-PPT) : réactif lyophilisé

Du sérum de cochon d'Inde normal, préalablement précipité avec du sérum anti-cochon d'Inde de chèvre et du polyéthylène glycol (PEG), est dilué dans un tampon BSA-borate contenant des conservateurs. Reconstituer le flacon avec 35 ml d'eau purifiée ; bien mélanger jusqu'à ce que la suspension soit homogène, puis laisser reposer pendant 30 minutes au moins à température ambiante en remuant de temps en temps.

4.6 Plasma de contrôle vasopressine : réactif lyophilisé

Le sérum humain est dopé, si besoin est, avec la quantité adéquate d'arginine-vasopressine afin d'obtenir une concentration comprise dans l'intervalle spécifié. De l'azide de sodium est ajouté comme conservateur. Reconstituer chaque flacon avec 2,5 ml d'eau purifiée et laisser reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu. Mélanger soigneusement et traiter le plasma de contrôle qualité comme un échantillon inconnu.

4.7 Silice octadécylsilylé : réactif lyophilisé

Les colonnes en plastique contiennent du silice octadécylsilylé (Sep-Pak). Les colonnes fournies dans la trousse doivent être "amorcées" avant d'appliquer l'échantillon (voir la section intitulée Procédure). Elles peuvent être conservées à température ambiante.

5. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.

Non prévu pour une utilisation interne ou externe sur l'homme ou l'animal.

RÉACTIFS CONTENANT DES PRODUITS D'ORIGINE HUMAINE

Traiter comme potentiellement infectieux.

Chaque don de sérum/plasma intervenant dans la préparation de ce produit a été testé par une méthode agréée par la FDA et s'est avéré non réactif en présence de HBsAg, d'anticorps anti-VHC et d'anticorps anti-VIH1/2. Même si ces méthodes sont extrêmement précises, elles ne garantissent pas la détection de tous les dons infectés. Ce produit peut également contenir d'autres produits d'origine humaine pour lesquelles il n'existe aucun test agréé. Comme aucune méthode de test connue ne peut offrir l'assurance complète de l'absence du virus de l'hépatite B (HBV) ou de l'hépatite C (HCV), du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou d'autres agents infectieux, tous les produits d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en prenant les précautions appropriées décrites dans le document U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,” 4ème éd., mai 1999 ou dernière édition.

RÉACTIFS CONTENANT DU NITRURE DE SODIUM

ATTENTION : Certains réactifs de cette trousse contiennent du nitrure de sodium. Le nitrure de sodium peut réagir avec la plomberie en plomb ou en cuivre et former des azotures ultra-explosifs. Pour leur mise au rebut, rincer à grande eau pour empêcher l'accumulation de nitrure. Pour plus d'informations, consulter “Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts,” dans le manuel Guide-Safety

Management No. CDC-22 publié par les Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 1999/45/EC)

R20/21/22 - Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.

R32 - Un contact avec les acides dégage des gaz très toxiques.

S28 - Après un contact avec la peau, laver immédiatement à grande eau.

RÉACTIFS CONTENANT DU THIMÉROSAL

Certains réactifs de cette trousse contiennent du thimérosal contenant un composant de mercure. La mise au rebut du mercure élémentaire, du mercure inorganique, des oxydes de mercure et des composants de mercure doit être effectuée en respectant scrupuleusement les réglementations locales, nationales et fédérales.

AVERTISSEMENT : ce produit contient un produit chimique connu dans l'État de Californie comme étant cancérigène.

RÉACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 1 µCi (37 kBq) d'iode 125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, acquis, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des vétérinaires pratiquant la médecine vétérinaire, des laboratoires cliniques et des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'une produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article de verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles de verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

AVERTISSEMENT : Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme étant cancérigène.

ATTENTION : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

6. INDICATIONS D'UNE DÉTÉRIORATION POSSIBLE DES RÉACTIFS DE LA TROUSSE

6.1 Présence de particules anormales dans l'un quelconque des réactifs.

6.2 Écart de pente ou de position de la courbe d'étalonnage par rapport à la normale obtenue.

6.3 Diminution de la liaison maximale.

6.4 Haute liaison non spécifique.

7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Deux millilitres de plasma EDTA sont requis pour l'extraction lors de cette procédure.

Prélever du sang par ponction veineuse dans un tube en verre à vide de 5 ou 10 ml. L'EDTA (7,2 mg/5 ml de sang) est utilisé comme anticoagulant. Centrifuger rapidement pendant

15 minutes à 760 x g.* Séparer le plasma dans les cellules et mettre dans des tubes de stockage. Il a été prouvé que la vasopressine est stable à température ambiante pendant plusieurs heures. Pour une conservation prolongée, congeler à une température inférieure ou égale à - 15° C. Tous les plastiques, articles en verre ou autres produits entrant en contact avec l'échantillon ne doivent absolument pas être contaminés.

REMARQUE : il a été constaté que le plasma et le sérum héparinés permettent des récupérations moindres. Par ailleurs, le plasma hépariné bouche parfois la colonne Sep-Pak.

* g = (1118 x 10^{-8}) (rayon en cm) $(tr/min)^2$

8. MATÉRIEL ET PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS

8.1 Tubes en verre borosilicaté jetables, 12 x 75 mm.

8.2 Centrifugeuse à thermostat pour tubes de 12 x 75 mm.

8.3 Compteur à scintillation gamma pouvant mesurer l'iode 125.

8.4 Agitateur Vortex.

8.5 Pipettes :

- **a.** Micropipettes calibrées pour délivrer 100 µl et 200 µl.
- **b.** Distributeurs à répétition calibrés pour distribuer 100 µl et 500 µl.

8.6 Seringues jetables de 12 ml.

8.7 Méthanol, de qualité réactif ou supérieure.

8.8 Acide acétique à 4 %.

8.9 Acide chlorhydrique 1 M.

8.10 Source d'air comprimé ou d'azote.

8.11 Bain d'eau à 37° C.

8.12 Tubes en verre jetables de 16 x 100 mm.

8.13 Eau purifiée

9. EXTRACTION DU PLASMA SUR LES COLONNES DE SILICE OCTADÉCYLSILYLÉ

9.1 Fixer chaque colonne Sep-Pak à un raccord de seringue.

9.2 Ajouter 5 ml de méthanol dans chaque seringue.

9.3 Appuyer sur le piston de la seringue pour la vider.

9.4 Retirer les colonnes Sep-Pak.*

9.5 Retirer les pistons des seringues.

9.6 Remettre les colonnes Sep-Pak en place sur les seringues.

9.7 Ajouter 10 ml d'eau purifiée dans chaque seringue.

9.8 Répéter les étapes 9.3 à 9.6.

9.9 Répéter l'étape 9.7, puis les étapes 9.3 à 9.6.

9.10 Acidifier 2 ml de plasma EDTA ou de contrôle avec 200 µl d'HCI 1 M. Le pH doit se situer entre 3 et 4. Charger l'échantillon dans la seringue et appuyer lentement (pendant une minute) pour le vider dans la colonne.

9.11 Répéter les étapes 9.4 à 9.6.

9.12 Rincer la colonne avec 20 ml d'acide acétique à 4 %.

* détacher la colonne sep-pak de l'extrémité de la seringue avant de retirer le piston

afin de ne pas contaminer le contenu de la seringue avec le liquide situé dans la colonne.

9.13 Répéter les étapes 9.3 à 9.6.

9.14 Prélever l'éluat dans des tubes de 16 x 100 mm en éluant le peptide avec 3 ml de méthanol. Appuyer lentement afin que le méthanol reste en contact avec le silice octadécylsilylé pendant 3 minutes minimum.

9.15 Répéter les étapes 9.4 à 9.6.

9.16 Passer 1 ml supplémentaire de méthanol afin de garantir une élution complète.

9.17 Laisser l'éluat de méthanol s'évaporer à siccité dans un bain d'eau à 37° C en utilisant un jet d'air (air comprimé) ou de l'azote. Les échantillons doivent être complètement secs. Ne les laisser dans le bain d'eau à 37° C que le temps requis pour qu'ils sèchent.

9.18 Reconstituer l'échantillon avec 0,5 ml de tampon BSA-borate à 1 %. (Un échantillon dont on escompte des valeurs élevées peut également être dilué avec du BSA-borate à 1 % à ce moment-là.) Mélanger avec l'agitateur Vortex et placer à 37° C pendant dix minutes pour obtenir une reconstitution de l'échantillon déshydraté. Mélanger avec l'agitateur Vortex après incubation.

9.19 Doser 200 µl en double dans le dosage radio-immunologique.

10. PROCÉDURE DE DOSAGE

10.1 Reconstituer les réactifs lyophilisés et laisser les réactifs congelés décongeler complètement. Ne pas laisser les réactifs atteindre une température supérieure à 20-25° C. Mélanger délicatement tous les réactifs avant utilisation.

10.2 Installer des tubes jetables de 12 x 75 mm étiquetés en doublet selon le Profil de dosage de la dernière page.

10.3 Ajouter les réactifs comme suit :

a. Tubes de numération totale
Laisser de côté jusqu'à l'étape 5.

b. Tubes de liaison non spécifique (NSB)
200 µl de BSA-borate à 1 %

c. Étalon 0
200 µl de BSA-borate à 1 %
100 µl d'antisérum vasopressine

d. Étalons
200 µl d'étalon vasopressine
100 µl d'antisérum vasopressine

e. Contrôles et échantillons inconnus extraits
200 µl d'extrait

100 µl d'antisérum vasopressine

10.4 Mélanger les tubes délicatement à l'aide du Vortex en évitant la formation de mousse et incuber pendant 18 à 24 heures entre 2 et 8° C.

10.5 Ajouter 100 µl de vasopressine ^{125}I dans tous les tubes.

10.6 Mélanger les tubes délicatement à l'aide du Vortex en évitant la formation de mousse et incuber pendant 18 à 24 heures entre 2 et 8° C.

10.7 Mélanger vigoureusement le complexe précipitant GAGP-PPT et ajouter 500 µl dans tous les tubes à l'exception des tubes de numération totale.

10.8 Mélanger délicatement les tubes à l'aide du vortex en évitant la formation de mousse et incuber pendant 15 à 25 minutes entre 20 et 25 °C.

10.9 Centrifuger les tubes pendant 20 minutes à 760 x g* entre 20 et 25° C.

10.10 Décanter immédiatement le surnageant dans tous les tubes à l'exception des tubes de numération totale, en les renversant pendant 2 minutes minimum. Placer les tubes sur du papier absorbant pour éliminer toutes les gouttes de surnageant qui peuvent rester dessus avant de les replacer à l'endroit.

10.11 A l'aide du compteur à scintillation gamma, effectuer la numération du précipité de chaque tube et des tubes de numération totale pendant le temps nécessaire à l'obtention d'une exactitude statistique (consulter le paragraphe Limitations de la Procédure).

11. COMMENTAIRES SUR LA PROCÉDURE

11.1 Doser tous les échantillons en double pour garantir la validité des valeurs obtenues.

11.2 Ajouter chaque aliquote de réactif au tiers inférieur du tube à essai pour garantir le mélange complet des réactifs.

11.3 Certains fabricants vendent des tubes jetables en verre borosilicaté qui donnent des liaisons non spécifiques élevées.

11.4 Si le surnageant est aspiré dans le précipité, prendre soin de ne pas remuer le précipité.

11.5 Pour surveiller complètement la précision constante d'un dosage RIA, il faut parfois vérifier des facteurs supplémentaires. DiaSorin suggère de vérifier les paramètres suivants afin d'assurer la constance des performances de la trousse.

a. Activité totale

b. Liaison maximale

Coups moyens par minute (CPM) du tube de l'étalon 0 / CPM moyen des tubes de numération totale.

c. Liaison non spécifique

CPM moyen du tube NSB / CPM moyen des tubes de numération totale.

d. Pente de la courbe d'étalonnage

Par exemple, surveiller les points d'inhibition de 80, 50 et 20 % de la courbe d'étalonnage.

* g = (1118 x 10^{-8}) (rayon en cm) $(tr/min)^2$

12. CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit inclure au moins deux échantillons de contrôle dans chaque dosage pour garantir la validité de leurs résultats. Déterminer ensuite la moyenne et l'écart-type pour chaque contrôle, sur un minimum de dix dosages. Une gamme de valeurs acceptable peut donc être obtenue pour ces contrôles en utilisant l'écart-type ±2 par rapport aux valeurs précédemment calculées. Le laboratoire de contrôle qualité de DiaSorin a déterminé un intervalle pour les contrôles fournis dans cette trousse. L'intervalle apparaît sur l'étiquette des flacons de contrôle.

13. CALCUL DES RÉSULTATS

Il existe de nombreuses méthodes de calcul des résultats des dosages radio-immunologiques. Chacune est basée sur l'obtention d'une courbe d'étalonnage en traçant l'ampleur de la liaison par rapport aux concentrations indiquées pour les étalons. Ce graphe peut être à l'échelle linéaire ou logarithmique. Chacune de ces méthodes donne essentiellement les mêmes valeurs pour les contrôles et les échantillons, même si certains dosages peuvent être mieux “adaptés” à une méthode particulière que d'autres. La méthode de calcul du laboratoire de contrôle qualité DiaSorin est % B/B_0 par rapport à la concentration logarithmique.

13.1 Calculer le CPM moyen pour chaque étalon, contrôle et échantillon inconnu.

13.2 Soustraire le CPM moyen des tubes NSB de toutes les numérations.

13.3 Diviser le CPM corrigé de chaque étalon, contrôle ou échantillon inconnu par le CPM corrigé de l'étalon 0.

$$B/B_0\ (\%) = \frac{\text{CPM de l'étalon ou de l'échantillon inconnu – CPM de NSB}}{\text{CPM de l'étalon 0 – CPM de NSB}} \times 100$$

13.4 En utilisant du papier quadrillé semi-logarithmique ou logarithmique à deux cycles, tracer le pourcentage B/B_0 pour les étalons vasopressine (axe vertical) par rapport à la concentration (axe horizontal).

13.5 Tracer la droite de meilleur ajustement d'un point à l'autre.

13.6 Interpoler les niveaux de vasopressine dans les échantillons inconnus d'après le

tracé.

13.7 Calculer la valeur de la vasopressine comme il convient. Par exemple : si 2 ml de plasma ont été extraits et reconstitués à 0,5 ml, diviser par quatre. Si 2 ml de plasma ont été extraits et reconstitués à 1,0 ml, diviser par deux.

13.8 Si la valeur d'un échantillon est supérieure à l'étalon le plus élevé, il doit être extrait une nouvelle fois avec un volume de plasma inférieur et/ou reconstitué avec un volume de BSA-borate à 1 % supérieur.

13.9 S'il reste un extrait, il peut également être redilué et dosé à nouveau.

13.10 Calculer la liaison maximale en divisant le CPM de l'étalon 0 par les numérations totales moyennes obtenues dans les tubes de numération totale.

TABLEAU II

Données d'échantillon RIA VASOPRESSINE de DiaSorin

Tube	CPM double	CPM moyen	CPM corrigé	Pourcentage lié (B/T)	Pourcentage (B/B_0)	Conc. graphe (pg/ml)	Conc. finale (pg/ml)
Num. tot.	5 841	5 917					
	5 992						
NSB	192	199		3,4			
	205						
Étalon 0	2 970	2 872	2 673	48,5	100		
	2 774						
Étalons (pg/ml)							
A(5)	2 537	2 566	2 367		88,6		
	2 595						
B(10)	2 374	2 324	2 125		79,5		
	2 274						
C(20)	1 772	1 779	1 580		59,1		
	1 785						
D(40)	1 200	1 234	1 035		38,7		
	1 268						
E(80)	819	819	620		23,2		
	818						
Échantillons à déterminer							
1	2 591	2 556	2 357		88,2	5,5	1,4
		2 521					
2	1 265	1 297	1 098		41,1	36,5	9,1
	1 329						

Des données d'échantillon typiques et une courbe d'étalonnage sont présentées au TABLEAU II et à la FIGURE 1 ; ces informations sont fournies à titre de référence seulement et ne doivent pas être utilisées pour le calcul d'une valeur quelconque.

COURBE D'ÉTALONNAGE POUR L'ÉCHANTILLON DE VASOPRESSINE

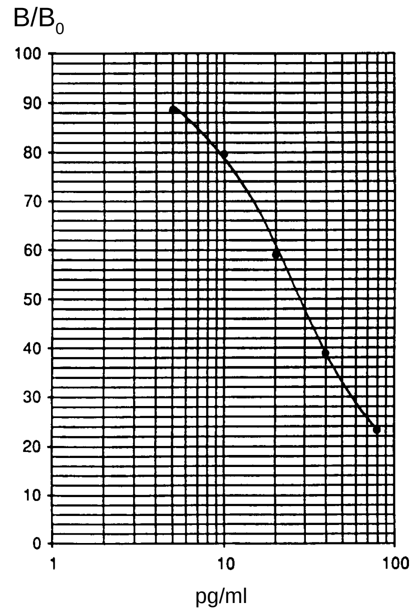


FIGURE 1

Données de réduction

Le laboratoire QC DiaSorin utilise un programme "smoothed spline curve".

14. LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

14.1 Prendre soin d'extraire tous les échantillons de façon uniforme.

14.2 Les temps de numération doivent être suffisants pour empêcher l'erreur statistique lors de la numération (par exemple, l'accumulation de 2 000 CPM donnera une erreur de 5 % et 10 000 CPM donneront une erreur de 1 %).

15. VALEURS ESCOMPTÉES

Valeurs Normales

Chaque laboratoire doit établir sa propre plage de valeurs de référence. Dans les échantillons des hommes et des femmes (n = 27), DiaSorin a déterminé que la valeur moyenne de la vasopressine était de 1,4 pg/ml, avec des valeurs normales comprises entre "non décelable" et 4,7 pg/ml. Les valeurs normales ont été calculées par l'extraction de 2 ml de plasma EDTA. Les réponses finales ont été divisées par quatre pour obtenir les valeurs normales comprises entre "non décelable" et 4,7 pg/ml. L'étape d'extraction et de concentration permet de reporter des valeurs qui, dans le cas contraire, seraient inférieures au seuil de sensibilité du dosage.

Les valeurs obtenues par DiaSorin sont conformes à celles recueillies par d'autres chercheurs. Dans une étude portant sur trente-et-un sujets normaux, l'intervalle normal déterminé pour la vasopressine dans le plasma est de 1,4 ±1,0 pg/ml.[1]

16. CRITÈRES DE QUALITÉ SPÉCIFIQUES

16.1 Précision

Variation intra-essai (valeurs = pg/ml)

Numéro d'échantillon	Valeur moyenne	Ecart-type	% C.V.
Bas	4,9	0,54	11,2
Moyen	22,7	1,38	6,1
Élevé	41,5	2,25	5,4

Variation inter-essai (valeurs = pg/ml)

Numéro d'échantillon	Valeur moyenne	Ecart-type	% C.V.
Bas	5,0	0,14	2,8
Élevé	40	1,78	4,4

16.2 Exactitude : l'exactitude du dosage a été vérifiée par le test de dilution et le test de récupération.

Linéarité (parallélisme)

ÉTUDE DE DILUTION EN SÉRIE SUR TROIS ÉCHANTILLONS PATIENT (VALEURS = PG/ML)

Numéro d'échantillon	Non dilué	1/2	1/4
1	5,4	5,5	4,7
2	9,3	8,9	9,0
3	3,5	3,1	2,8

Récupération (précision) (Valeurs = pg/ml)

Valeur de référence	Étalon ajouté	Valeur escomptée	Valeur mesurée	Pourcentage de récupération
Lot N° 1				
2,2	3,0	5,2	4,8	92
2,2	5,0	7,2	6,3	88
2,2	10	12,2	11	90
Lot N° 2				
1,9	3,0	4,9	5,0	102
1,9	10	11,9	10,1	85
1,9	20	21,9	20,3	93

16.3 Sensibilité Analytique

Définie comme la concentration obtenue à 3 écarts-types de l'activité de liaison maximale, la quantité minimale décelable est de 2,5 pg/ml. Tout échantillon patient dont la valeur est inférieure à 2,5 pg/ml avant correction selon le facteur de dilution ne peut pas être distingué de zéro.

16.4 Spécificité Analytique

La comparaison de la réactivité de l'anticorps anti-vasopressine a été effectuée avec les peptides suivants :

Peptide	% réaction croisée
Arginine-vasopressine	100
Lysine-vasopressine	600
Ocytocine	<0,01
Vasotocine	0,14

VOIR LA DERNIÈRE PAGE POUR RÉFÉRENCE

PROCÉDURE DE DOSAGE

1. Reconstituer les réactifs lyophilisés et permettre aux échantillons congelés de décongeler complètement. Ne pas laisser les réactifs atteindre une température supérieure à 25 °C. Identifier les tubes en double.
2. Extraire les contrôles et les échantillons inconnus selon les instructions données à la section neuf.
3. Ajouter les réactifs dans les tubes comme suit :

Tubes/Réactifs	Numé-rations totales	NSB	Étalon 0	Étalon 1-5	Contrôles et échantillons inconnus
Tampon BSA-borate à 1 %	-	200 µl	200 µl	-	-
Étalons (1-5)	-	-	-	200 µl	-
Contrôles extraits	-	-	-	-	200 µl
Échantillons inconnus extraits	-	-	-	-	200 µl
Antisérum	-	-	100 µl	100 µl	100 µl

4. Couvrir les tubes avec du parafilm et agiter délicatement à l'aide du vortex.
5. Laisser incuber pendant 18 à 24 heures entre 2 et 8° C.
6. Distribuer 100 µl de traceur dans toutes les cupules.
7. Couvrir et mélanger doucement à l'aide du vortex.
8. Laisser incuber pendant 18 à 24 heures entre 2 et 8° C.
9. Distribuer 500 µL de complexe précipitant GAGP-PPT dans toutes les cupules, à l'exception des tubes de numération totale.
10. Incuber pendant 15 à 25 minutes entre 20 et 25°C.
11. Centrifuger à 760 x g* pendant 20 minutes.
12. Décanter les surnageants.
13. Compter chaque tube dans un compteur gamma pendant 60 secondes ou plus.

*g = (1 118 x 10^{-8}) (rayon en cm) (tr/min)^2

VASOPRESSIN-RADIOIMMUNOASSAY

1. VERWENDUNGSZWECK

NUR ZUR *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK.

Dieses Kit dient zur quantitativen Bestimmung von humanem Arginin-Vasopressin (AVP, ADH) in Plasma oder anderen Proben durch Radioimmunoassay (RIA) im Anschluss an eine Extraktion mit Hilfe von ODS-Silica.

2. ÜBERBLICK UND ERKLÄRUNG

Arginin-Vasopressin (AVP) ist ein zyklisches Peptid, das aus neun Aminosäuren besteht. Die Struktur von AVP ist der Struktur von Oxytocin sehr ähnlich und unterscheidet sich nur durch zwei Aminosäuren. Aufgrund seiner starken antidiuretischen Wirkungen ist Vasopressin auch als „antidiuretisches Hormon“ (ADH) bekannt. AVP wirkt im Wesentlichen auf den Sammeltubulus der Niere, indem es einen Anstieg der Durchlässigkeit für Wasser und Harnstoff bewirkt, jedoch nicht für größere Moleküle. Außerdem besitzt AVP Neurotransmitterfunktionen, dient als Freisetzungsfaktor und erfüllt periphere humorale Funktionen.[1]

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass AVP an zwei Orten im Hypothalamus, dem supraoptischen und dem paraventrikulären Kern, produziert wird.

AVP wird vom supraoptischen Kern über Axone durch den neurohypophysären Trakt zum Hypophysenhinterlappenextrakt transportiert, wo die Axone als Endfüßchen an Kapillaren enden. Von dieser Region aus erfolgt die Sekretion von AVP in den peripheren Kreislauf, möglicherweise in Verbindung mit proteintragenden Molekülen, die als “Neurophysin“ bekannt sind.[2-4]

Es scheint wahrscheinlich, dass AVP aus dem paraventrikulären Kern in Kapillare des portalen Hypothalamus-Hypophysen-Systems sekretiert und zum Hypophysenvorderlappenextrakt geleitet wird, wo es möglicherweise die Freisetzung von Adrenocorticotropin (ACTH) stimuliert.

Es ist bekannt, dass die AVP-Freisetzung durch eine Reihe von osmotischen und nicht osmotischen Reizen hervorgerufen wird. Ein negatives Rückkopplungssystem, das die Niere, das zentrale Nervensystem und den Durstmechanismus umfasst, ist vorhanden und ermöglicht die Regulation der Konzentration in der Körperflüssigkeit. Die AVP-Freisetzung wird außerdem durch eine Reihe von anderen Faktoren beeinflusst, darunter emotionaler Stress, Körperhaltung, Blutvolumen, Temperatur und viele pharmakologische Wirkstoffe. Durch Alkohol scheint die AVP-Sekretion leicht gehemmt zu werden.[5-7]

Der AVP-Test wird für Untersuchungen in Bezug auf Diabetes insipidus, das Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion (SIADH), das Syndrom der ektopischen AVP-Produktion sowie psychogene Wasserintoxikation angewendet.[5,8]

Der AVP-RIA ist sehr hilfreich bei der Unterscheidung von zentralem Diabetes insipidus und nephrogenem Diabetes insipidus. Der zentrale Diabetes insipidus, der durch übermäßig starken Durst (Polydipsie) und die Passage von großen Mengen verdünnten Urins (Polyurie) gekennzeichnet ist, wird durch unzureichende AVP-Produktion hervorgerufen. Zentraler Diabetes insipidus kann entweder familiär bedingt oder idiopathisch sein und kann sowohl männliche als auch weibliche Personen jeden Alters betreffen. Dagegen wird nephrogener Diabetes insipidus dadurch hervorgerufen, dass die Nierentubuli nicht auf Vasopressin reagieren, wodurch sie unfähig zur Reabsorption von Wasser werden.
Nephrogener Diabetes insipidus, der erblich bedingt ist, im Allgemeinen männliche Personen betrifft und normalerweise in der frühen Kindheit auftritt, ist durch normale zirkulierende AVP-Konzentrationen charakterisiert.[4, 9, 10]
SIADH bezieht sich auf eine unangemessene Freisetzung von Vasopressin bei geringer Serum-Osmolalität.[11, 5] Es kann durch zahlreiche Umstände verursacht werden, darunter Lungenerkrankungen, Schädeltrauma (Verletzung oder chirurgischer Eingriff), lokale Infektionen und Krebs. Bestimmte Neoplasmen (vor allem Bronchialkarzinome) produzieren AVP oder AVP-ähnliche Peptide. Dieses Syndrom der ektopischen Vasopressinproduktion ist im Allgemeinen durch eine anhaltend starke Erhöhung der AVP-Konzentrationen charakterisiert.[12]
Die psychogene Wasserintoxikation wird durch zwanghaften und übermäßig hohen Wasserkonsum verursacht. Sie ist nicht die Folge einer physischen Erkrankung, sondern vielmehr, wie durch den Namen angedeutet wird, eine Verhaltensstörung.

3. TESTPRINZIP

Der DiaSorin AVP-RIA besteht aus 2 Verfahren. Beim ersten Verfahren werden die Proben mit Hilfe der in dem Kit enthaltenen Octadecasilyl-Silica- (ODS-Silica-) Säulen extrahiert. Danach werden die extrahierten Proben mit Hilfe eines Dysäquilibrium-RIA-Verfahrens zur Maximierung der Empfindlichkeit getestet. Probe und erster Antikörper werden bei 2-8°C 18-24 Stunden lang vorinkubiert; anschließend wird ein Tracer hinzugegeben, gefolgt von einer zweiten Inkubation bei 2–8 °C. Die Phasentrennung erfolgt innerhalb von 15-25 Minuten bei 20-25°C mit einem vorpräzipitierten Komplex aus einem zweiten Antikörper, einem Träger und PEG, der in einem einzigen Pipettenschritt hinzugegeben wird.

4. REAGENZIEN DES KITS

Vasopressin-1% BSA-Boratpuffer	1 Fläschchen / 35 ml
Vasopressin-Kalibrator	1 Fläschchen / 2,0 ml
Vasopressin-Antiserum	1 Fläschchen / 7 ml
^{125}I-Vasopressin	1 Fläschchen / 7 ml
Präzipitierender Komplex (GAGP-PPT)	1 Fläschchen / 35 ml
Vasopressin-Kontrollplasma	2 Fläschchen / 2,5 ml
Anzahl der Tests	65

LAGERUNG: Nach Empfang und vor der Rekonstitution alle Reagenzien bei 2–8 °C

aufbewahren. Nach der Rekonstitution sind dagegen alle Reagenzien bis zu dem auf dem

Etikett angegebenen Verfallsdatum bei höchstens –15° zu lagern. Die Reagenzien dürfen nach dem Verfallsdatum nicht verwendet werden.

Bei der Rekonstitution den Inhalt der Fläschchen vorsichtig mischen, um Schaumbildung zu vermeiden. Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt werden.

4.1 Vasopressin-1% BSA-Boratpuffer: lyophilisiertes Reagenz

1% BSA-Boratpuffer enthält Thimerosal als Konservierungsmittel. Das Fläschchen mit 35 ml destilliertem Wasser rekonstituieren und 15-20 Minuten lang bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

4.2 Arginin-Vasopressin-Kalibrator: lyophilisiertes Reagenz

Gereinigtes Arginin-Vasopressin wird bei einer Nominalkonzentration von 80 pg/ml in thimerosalhaltigem BSA-Boratpuffer verdünnt. Jeder Charge sind genaue Werte zugeteilt.

Das Fläschchen mit 2,0 ml destilliertem Wasser rekonstituieren, mischen und 15-20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen. Um die vollständige Eichkurve zu erhalten, Reihenverdünnungen durch Zugabe von 500 µl Kalibrator zu 500 µl 1% BSA-Borat vornehmen, um Kalibratoren mit 40, 20, 10 und 5 pg/ml zu erhalten. (Diese Werte schwanken je nach der genauen Konzentration der Kalibrator-Charge.)

500 µl von 80 pg/ml Kalibrator zu 500 µl 1% BSA-Borat geben und mischen, um 40 pg/ml zu erhalten.

500 µl von 40 pg/ml Kalibrator zu 500 µl 1% BSA-Borat geben und mischen, um 20 pg/ml zu erhalten.

500 µl von 20 pg/ml Kalibrator zu 500 µl 1% BSA-Borat geben und mischen, um 10 pg/ml zu erhalten.

500 µl von 10 pg/ml Kalibrator zu 500 µl 1% BSA-Borat geben und mischen, um 5 pg/ml zu erhalten.

Der DiaSorin-Vasopressin-Kalibrator wurde gegen die WHO-Präparation 77/501 kalibriert. Ein Empfindlichkeitsvergleich mit anderen Produkten oder Verfahren sollte auf der Grundlage dieses Referenzstandards erfolgen. Die Kalibratoren des Kits sind mit Patientenproben austauschbar, wenn sie mit Reagenzien verwendet werden und dieser diagnostische *in-vitro*-Test wie empfohlen durchgeführt wird.

4.3 Vasopressin-Antiserum: lyophilisiertes Reagenz

Guineaschwein-anti-Vasopressin-Serum wird in thimerosalhaltigem BSA-Boratpuffer verdünnt. Das Fläschchen mit 7 ml destilliertem Wasser rekonstituieren und 15-20 Minuten lang bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

4.4 ^{125}I-Vasopressin: lyophilisiertes Reagenz

(Lys^{8}) Vasopressin wird mit Jod-125 markiert und in thimerosalhaltigem BSA-Borat-EDTA-Puffer verdünnt. Das Fläschchen mit 7 ml destilliertem Wasser rekonstituieren und 15-20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

4.5 Präzipitierender Komplex (GAGP-PPT): lyophilisiertes Reagenz

Normales Guineaschweinserum, vorpräzipitiert mit Ziege-anti-Guineaschwein-Serum und Polyethylenglykol (PEG), wird in BSA-Boratpuffer unter Zugabe von Konservierungsmitteln verdünnt. Das Fläschchen mit 35 ml destilliertem Wasser rekonstituieren; gründlich mischen, bis die Suspension homogen erscheint, und dann mindestens 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen und hin und wieder schütteln.

4.6 Vasopressin-Kontrollplasma: lyophilisiertes Reagenz

Falls notwendig, wird Humanplasma mit der entsprechenden Menge Arginin-Vasopressinversetzt, um eine Konzentration innerhalb eines bestimmten Bereichs zu erzielen. Zugabe von Natriumazid als Konservierungsmittel. Jedes Fläschchen mit 2,5 ml destilliertem Wasser rekonstituieren und 15-20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; gründlich mischen und das Qualitätskontrollplasma als unbekannte Probe behandeln.

4.7 ODS-Silica: lyophilisiertes Reagenz

Octadecylsilyl-Silica ist in Kunststoffsäulen (Sep-Paks) enthalten. Die im Kit enthaltenen ODS-Silicasäulen müssen vor Anwendung der Probe „geprimed“ werden (siehe Abschnitt über das entsprechende Verfahren). Die Säulen können bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Nicht für internen oder externen Gebrauch bei Menschen oder Tieren.

REAGENZIEN MIT MATERIAL HUMANEN URSPRUNGS

Dieses Produkt ist als potenziell infektiös zu behandeln.

Alle in der Herstellung dieses Produktes verwendeten Serum- bzw. Plasmaspendeeinheiten wurden nach einer FDA-genehmigten Methode getestet und für nicht reaktiv auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis-C-Antikörper (HCV) und Antikörper für HIV-1/2 befunden. Obwohl diese Methode äußerst genau ist, bietet sie keine Gewähr dafür, dass alle infizierten Einheiten identifiziert werden können. Dieses Produkt kann auch Material humanen Ursprungs enthalten, für welches es noch kein genehmigtes Testverfahren gibt. Da keine der zur Zeit bekannten Testmethoden absolute Gewähr für die Abwesenheit des Hepatitis-B-Virus (HBV), des Hepatitis-C-Virus (HCV), des Retrovirus (HIV) oder anderer Infektionserreger bieten kann, sind alle Produkte mit Komponenten humanen Ursprungs unter Einhaltung guter Laborpraktiken und entsprechender Vorsichtsmaßnahmen laut Empfehlungen des Leitfadens der Centers for

Disease Control and Prevention/National Institutes of Health (amerikanische Krankheitsforschungszentren/Staatliche Gesundheits-institute): “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories” (Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboren), 4. Auflage, Mai 1999, oder aktuelle Auflage, als potenzielle infektiöse Substanzen zu behandeln.

REAGENZIEN MIT NATRIUMAZID

ACHTUNG: Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid, das ggf. mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und höchst explosive Metallazide bilden kann. Zur Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen, um Azidbildung zu vermeiden. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt “Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts” des Handbuches "Safety Management" Nr. CDC-22, herausgegeben vom Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, 1976.

Europäische Gemeinschaften: Gefahrenbezeichnungen für gefährliche Stoffe (Richtlinie 1999/45/EG)

R20/21/22 - Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.

R32 - Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

S28 - Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.

THIMEROSALHALTIGE REAGENZIEN

Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Thimerosal, das unter anderem auch eine Quecksilberverbindung enthält. Die Entsorgung von elementarem oder anorganischem Quecksilber sowie von Quecksilberoxiden und -komponenten muss unter strikter Einhaltung aller lokalen, einzelstaatlichen und bundesstaatlichen Vorschriften erfolgen.

WARNHINWEIS: Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien krebserregend ist.

REAGENZIEN MIT IOD-125

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit maximal 1 µCi (37 kBq) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, die im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Dieses radioaktive Material darf nur von Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Laboren oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests, bei denen das Material oder dessen Strahlung keinen Menschen oder Tieren intern oder extern verabreicht wird, empfangen, erworben, besessen und verwendet werden. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US. Nuclear Regulatory Commission bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. **1.** Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. **2.** Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. **3.** Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. **4.** Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. **5.** Verschüttetes Material aufwischen und den Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung wischen. Alle benutzten Glasbehälter gründlichst mit Wasser spülen, bevor sie zusammen mit anderen Laborbehältern aus Glas ausgewaschen werden.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

VORSICHT: Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien krebserregend ist.

WICHTIGER HINWEIS: Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität des Kits angibt.

6. ANZEICHEN FÜR MÖGLICHEN VERFALL DER KITREAGENZIEN

6.1 Das Vorhandensein abnormer Partikel in einem der Reagenzien.

6.2 Eine Verschiebung der Steigung oder Position der Kalibratorkurve im Vergleich zu den normalen Ergebnissen.

6.3 Eine Abnahme der maximalen Bindung.

6.4 Eine hohe nichtspezifische Bindung.

7. PROBENGEWINNUNG UND VORBEREITUNG

Für die Extraktion in diesem Verfahren sind 2 Milliliter EDTA-Plasma erforderlich.
Das Vollblut durch Venenpunktion in einem evakuierten Glasröhrchen für 5 ml oder 10 ml sammeln. Als Antikoagulationsmittel wird EDTA (7,2 mg/5 ml Blut) verwendet. Unverzüglich 15 Minuten lang mit 760 x g* zentrifugieren. Das Plasma von den Zellen trennen und in Röhrchen füllen. Vasopressin hat sich bei Raumtemperatur mehrere Stunden lang als stabil erwiesen. Für eine längere Lagerung bei -15°C oder tieferen Temperaturen einfrieren. Alle Kunststoffteile, Glasteile und sonstigen Materialien, die Kontakt mit den Proben haben, müssen frei von jeglichen Verunreinigungen sein.

* g = (1118 x 10^{-8}) (radius in cm) $(u/min)^2$

HINWEIS: Es wurde beobachtet, dass bei Verwendung von heparinisiertem Plasma oder Serum möglicherweise geringere Wiederfindungen erhalten werden. Außerdem kann durch heparinisiertes Plasma gelegentlich die Sep-Pak-Säule verstopft werden.

8. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND MATERIALIEN

8.1 Einweg-Borosilikatglasröhrchen, 12 x 75 mm

8.2 Zentrifuge für 12 x 75 mm-Röhrchen, temperaturgesteuert

8.3 Gammaszintillationszähler zur Zählung von Jod-125

8.4 Vortexer

8.5 Pipettiergeräte:

- **a.** Auf die Abgabe von 100 µl und 200 µl kalibrierte Mikropipetten
- **b.** Auf die Abgabe von 100 µl und 500 µl kalibrierte Multipipetten

8.6 12 ml-Einwegspritzen

8.7 Methanol (Reagenzgrad oder besser)

8.8 4%ige Essigsäure

8.9 1 M Salzsäure

8.10 Luftdruck- oder Stickstoffversorgung

8.11 Wasserbad bei 37°C

8.12 Einweg-Glasröhrchen, 16 x 100 mm

8.13 Destilliertes Wasser

9. EXTRAKTION VON PLASMA MIT ODS-SILICASÄULEN

9.1 Jede Sep-Pak-Säule an einem Spritzenverteiler befestigen.

9.2 5 ml Methanol in jede Spritze geben.

9.3 Den Inhalt mit Hilfe des Spritzenkolbens durch die Spritze pressen.

9.4 Die Sep-Paks entfernen.*

9.5 Den Spritzenkolben aus den Spritzen entfernen.

9.6 Die Sep-Paks wieder an den Spritzen anbringen.

9.7 10 ml destilliertes Wasser in jede Spritze geben.

9.8 Die Schritte 9.3 bis 9.6 wiederholen.

9.9 Schritt 9.7 und anschließend die Schritte 9.3 bis 9.6 wiederholen.

* Die Sep-Pak-Säule vom Spritzenende entfernen, bevor der Kolben entfernt wird, um eine Kontamination des Spritzeninhalts mit der in der Sep-Pak-Säule enthaltenen Flüssigkeit zu vermeiden.

9.10 2 ml EDTA-Plasma oder Kontrollplasma mit 200 µl 1 M HCI ansäuern. Der pH-Wert sollte bei 3-4 liegen. Die Probe in die Spritze ziehen und langsam über einen Zeitraum von einer Minute durch die Säule pressen.

9.11 Die Schritte 9.4 bis 9.6 wiederholen.

9.12 Die Säule mit 20 ml 4%iger Essigsäure spülen.

9.13 Die Schritte 9.3 bis 9.6 wiederholen.

9.14 Das Eluat durch Elution des Peptids mit 3 ml Methanol in 16 x 100 mm-Röhrchen sammeln. Langsam drücken, so dass das Methanol mindestens 3 Minuten lang in Kontakt mit der ODS-Silicasäule bleibt.

9.15 Die Schritte 9.4 bis 9.6 wiederholen.

9.16 Zusätzlich mit 1 ml Methanol eluieren, um eine vollständige Elution sicherzustellen.

9.17 Das Methanol-Eluat in einem Wasserbad bei 37°C mit einem Luftstrahl (Druckluft) oder mit Stickstoff zu trockenem Methanol verdampfen lassen. Die Proben müssen vollständig getrocknet sein. Die Proben nicht länger als zum Trocknen erforderlich in dem 37°C warmen Wasserbad belassen.

9.18 Die Probe mit 0,5 ml 1% BSA-Boratpuffer rekonstituieren. (Eine Probe, bei der ein erhöhter Wert erwartet wird, kann in diesem Schritt mit mehr 1% BSA-Borat verdünnt werden.) Vortexen und 10 Minuten lang in ein 37°C warmes Wasserbad stellen, um die Rekonstitution der getrockneten Probe sicherzustellen. Nach der Inkubation vortexen.

9.19 200 µl in doppelter Ausführung im Radioimmunoassay testen.

10. TESTVERFAHREN

10.1 Lyophilisierte Reagenzien rekonstituieren und gefrorene Reagenzien vollständig auftauen lassen. Die Reagenzien dürfen maximal auf 20–25 °C erwärmt werden. Alle Reagenzien vor dem Gebrauch leicht mischen.

10.2 Markierte 12 x 75 mm-Einwegröhrchen in Zweierreihen aufstellen (siehe Testplan auf der Rückseite).

10.3 Reagenzien wie folgt zugeben:

a. Röhrchen für die Gesamtzählung
Bis Schritt 5 beiseite legen.

b. NSB-Röhrchen
200 µl 1% BSA-Borat

c. Nullkalibrator
200 µl 1% BSA-Borat
100 µl Vasopressin-Antiserum

d. Kalibratoren
200 µl Vasopressin-Kalibrator

100 µl Vasopressin-Antiserum

e. **Extrahierte Kontrolle und unbekannte Proben**
200 µl Extrakt
100 µl Vasopressin-Antiserum

10.4 Die Röhrchen vorsichtig ohne Schaumbildung vortexen und 18–24 Stunden lang bei 2–8 °C inkubieren.

10.5 100 µl ^{125}I-Vasopressin zu allen Röhrchen hinzugeben.

10.6 Die Röhrchen vorsichtig ohne Schaumbildung vortexen und 18–24 Stunden lang bei 2–8 °C inkubieren.

10.7 Den GAGP-PPT-Komplex gründlich mischen und 500 µl zu allen Röhrchen außer den Totalaktivität-Röhrchen hinzugeben.

10.8 Die Röhrchen vorsichtig ohne Schaumbildung vortexen und 15-25 Minuten bei 20–25 °C inkubieren.

10.9 Die Röhrchen 20 Minuten lang mit 760 x g* bei 20-25 °C zentrifugieren.

10.10 Die Überstände durch mindestens 2 Minuten langes Umdrehen der Röhrchen sofort aus allen Röhrchen außer den Totalaktivität-Röhrchen dekantieren. Bevor die Röhrchen aufrecht gestellt werden, die Röhrchen auf Saugpapier abtupfen, um alle eventuellen Tropfen von Überständen auf den Röhrchen zu entfernen.

10.11 Mit einem Gammaszintillationszähler den Niederschlag in jedem Röhrchen und den Totalaktivität-Röhrchen für eine ausreichend lange Zeit auszählen, um statistische Genauigkeit zu erhalten. (Siehe Abschnitt “Grenzen des Verfahrens”).

11. ANMERKUNGEN ZUM VERFAHREN

11.1 Alle Proben in doppelter Ausführung testen, um die gemessenen Werte zu bestätigen.

11.2 Jedes Aliquot des Reagenzes in das untere Drittel des Teströhrchens hinzugeben, damit sich die Reagenzien vollständig vermischen.

11.3 Die Einweg-Borosilikatglasröhrchen einiger Hersteller führen zu hohen nichtspezifischen Bindungen.

11.4 Falls Sie es vorziehen, den Überstand vom Präzipitat abzusaugen, achten Sie dabei sorgfältig darauf, das Präzipität nicht aufzurühren.

11.5 Um die konsistente Leistung eines Radioimmunoassays vollständig zu überwachen, müssen möglicherweise weitere Faktoren überprüft werden. DiaSorin empfiehlt, die folgenden Parameter regelmäßig zu überprüfen, um eine konsistente Leistung des Kits sicherzustellen.

a. Gesamtzählung

b. Maximale Bindung

Durchschnittliche Zählungen pro Minute (CPM) des Nullkalibrator-Röhrchens / Durchschnittliche CPM der Totalaktivität-Röhrchen.

* g = (1118 x 10^{-8}) (Radius in cm) $(\text{U/min})^2$

c. Nichtspezifische Bindung

Durchschnittliche CPM des NSB-Röhrchens / Durchschnittliche CPM der Totalaktivität-Röhrchen.

d. Steigung der Kalibratorkurve

Z. B. Überwachung der Suppressionspunkte 80%, 50% und 20% der Kalibratorkurve.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte mindestens zwei Kontrollproben für jeden Test vorsehen, damit die Gültigkeit der Testergebnisse überprüft werden kann. Ein Mittelwert und eine Standardabweichung sind dann für jede Kontrolle in mindestens zehn Versuchsgängen zu bestimmen. Ein zulässiger Wertebereich kann dann für diese Kontrollen mit ±2 Standardabweichungen der zuvor bestimmten Werte ermittelt werden. Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin hat für die in diesem Kit enthaltene Kontrolle einen Bereich festgelegt, der auf dem Kontrollfläschchen aufgedruckt ist.

13. ERGEBNISBERECHNUNG

Es gibt viele Möglichkeiten, die Ergebnisse von Radioimmunoassays zu berechnen. Bei jeder Methode wird eine Kalibratorkurve angelegt, indem die prozentualen Bindungen gegen die angegebenen Konzentrationen der Kalibrations-Kalibratoren aufgetragen werden. Diese Kurve kann entweder eine lineare oder eine logarithmische Skala besitzen. Jede dieser Methoden führt im Wesentlichen zu denselben Werten für Kontrollen und Proben; bei einigen Tests ist die eine Methode jedoch möglicherweise besser geeignet als die andere. Die Umrechnungsmethode für das DiaSorin-Qualitätskontrolllabor lautet % B/B_0 gegen log Konzentration.

13.1 Die durchschnittliche CPM für die einzelnen Kalibratoren, Kontrollen und unbekannten Proben berechnen.

13.2 Die durchschnittliche CPM der NSB-Röhrchen von allen Zählungen abziehen.

13.3 Die korrigierten CPM jedes Kalibrators, jeder Kontrolle oder unbekannten Probe durch die korrigierten CPM des Nullkalibrators dividieren.

$$B/B_0\ (\%) = \frac{\text{CPM des Kalibrators oder der unbekannten Probe – CPM der NSB}}{\text{CPM des Nullkalibrators – CPM der NSB}} \times 100$$

13.4 Auf halblogarithmischem Millimeterpapier (2 Zyklen) oder doppeltlogarithmischem Millimeterpapier prozentuale Bindungen B/B_0 für die Vasopressin-Kalibratoren (vertikale Achse) gegen die Konzentration (horizontale Achse) auftragen.

13.5 Durch die Punkte eine Ausgleichsgerade legen.

13.6 Die Konzentrationen von Vasopressin in den unbekannten Proben aus der Auftragung interpolieren.

13.7 Den Vasopressin-Wert entsprechend berechnen. Beispiel: Wenn 2 ml Plasma zu 0,5 ml extrahiert und rekonstituiert wurden, den Wert durch 4 dividieren; wenn 2 µl Plasma zu 1,0 ml extrahiert und rekonstituiert wurden, den Wert durch 2 dividieren.

13.8 Wenn der Wert für eine Probe größer ist als der größte Kalibratorwert, sollte die Probe mit einem geringeren Plasmavolumen erneut extrahiert und/oder mit einem höheren Volumen an 1% BSA-Borat rekonstituiert werden.

13.9 Wenn Extrakt übrig bleibt, kann dieser ebenfalls weiter verdünnt und erneut getestet werden.

13.10 Die maximale Bindung wird berechnet, indem die CPM des Nullkalibrators durch die in den Totalaktivität-Röhrchen erhaltenen Gesamtzählungen dividiert wird.

TABELLE II

DiaSorin Vasopressin RIA -Probendaten

Röhrchen	Doppelte CPM	Durchschn. CPM	Korrigierte CPM	Prozent gebunden (B/T)	Prozent (B/B_0)	Kurven-konz. (pg/ml)	End-konz. (pg/ml)
Gesamtzählung	5.841 5.992	5.917					
NSB	192 205	199		3,4			
Nullkalibrator	2.970 2.774	2.872	2.673	48,5	100		
Kalibratoren (pg/ml)							
A (5)	2.537 2.595	2.566	2.367		88,6		
B (10)	2.374 2.274	2.324	2.125		79,5		
C (20)	1.772 1.785	1.779	1.580		59,1		
D (40)	1.200 1.268	1.234	1.035		38,7		
E (80)	819 818	819	620		23,2		
Unbekannte Proben							
1	2.591	2.556 2.521	2.357		88,2	5,5	1,4
2	1.265 1.329	1.297	1.098		41,1	36,5	9,1

Typische Probendaten und eine Eichkurve werden in TABELLE II und ABBILDUNG 1 gezeigt; diese Informationen dienen nur als Beispiel und sollten nicht zur Berechnung von Probenwerten verwendet werden.

VASOPRESSIN-BEISPIELKALIBRATORKURVE

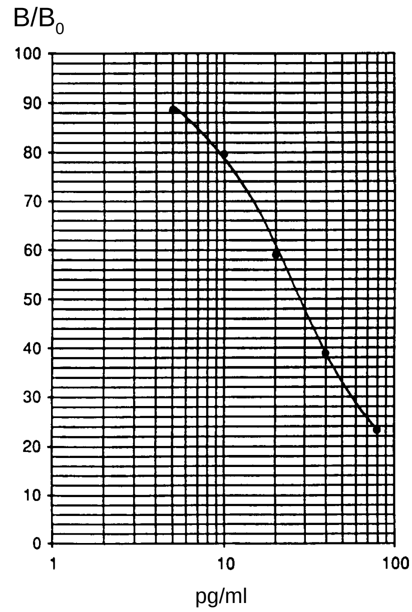


ABBILDUNG 1

Daten nach der Datenreduktion

Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin verwendet eine geglättete Spline-Kurvenanpassung.

14. GRENZEN DES VERFAHRENS

14.1 Das Verfahren muss vorsichtig durchgeführt werden, so dass alle Proben einheitlich extrahiert werden.

14.2 Die Zählzeiten sollten ausreichend lang sein, um das Auftreten von statistischen Fehlern bei der Zählung zu vermeiden (2.000 CPM ergeben z. B. 5% Fehler; 10.000 CPM ergeben 1% Fehler).

15. ERWARTETE WERTE

Normalbereich

Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalbereich ermitteln. Bei Proben von männlichen und weiblichen Personen (n = 27) hat DiaSorin den mittleren Vasopressin-Wert auf 1,4 pg/ml bei einem ND-Normalbereich von 4,7 pg/ml festgelegt (ND = Non-detectable, nicht nachweisbar). Die Normalwerte wurden durch Extraktion von 2 ml EDTA-Plasma berechnet. Die endgültigen Lösungen wurden durch 4 dividiert, um den Normalbereich von ND-4,7 pg/ml zu erhalten. Durch den Extraktions- und den Konzentrationsschritt können Werte berichtet werden, die ansonsten unterhalb der Empfindlichkeit des Tests liegen würden.

Die von DiaSorin erhaltenen Werte stimmen mit den von anderen Forschern ermittelten Werten überein. Bei einer Untersuchung mit 31 normalen Versuchspersonen wurde der Normalbereich für Plasma-Vasopressin auf 1,4 ± 1,0 pg/ml festgelegt.[1]

16. TESTCHARAKTERISTIKA

16.1 Präzision

Intra-Testvarianz (Werte = pg/ml)

Probennummer	Mittelwert	SA	% VK
Niedrig	4,9	0,54	11,2
Mittel	22,7	1,38	6,1
Hoch	41,5	2,25	5,4

Inter-Testvarianz (Werte = pg/ml)

Probennummer	Mittelwert	SA	% VK
Niedrig	5,0	0,14	2,8
Hoch	40	1,78	4,4

16.2 Richtigkeit: Die Richtigkeit des Assays wurde mit Hilfe des Verdünnungs- und des Wiederfindungstests überprüft.

Linearität (Parallelität)

Serienverdünnung von 3 Patientenproben (Werte = pg/ml)

Probennummer	Unverdünnt	1/2	1/4
1	5,4	5,5	4,7
2	9,3	8,9	9,0
3	3,5	3,1	2,8

Wiederfindung (Genauigkeit) (Werte = pg/ml)

Hintergrund	Hinzugefügter Kalibrator	Erwarteter Wert	Gemessener Wert	Prozent Wiederfindung
Satz Nr. 1				
2,2	3,0	5,2	4,8	92
2,2	5,0	7,2	6,3	88
2,2	10	12,2	11	90
Satz Nr. 2				
1,9	3,0	4,9	5,0	102
1,9	10	11,9	10,1	85
1,9	20	21,9	20,3	93

16.3 Analytische Sensitivität

Wenn die geringste nachweisbare Konzentration als die scheinbare Konzentration bei 3 Standardabweichungen von den Zählungen bei maximaler Bindung definiert wird, beträgt sie 2,5 pg/ml. Wenn der Wert einer Patientenprobe vor der Korrektur mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor kleiner ist als 2,5 pg/ml, kann er nicht von dem Wert Null unterschieden werden.

16.4 Analytische Spezifität

Der Vergleich der Reaktivität des Vasopressin-Antikörpers wurde mit den folgenden Peptiden durchgeführt:

Peptid	**% Kreuzreaktivität**
Arginin-Vasopressin	100
Lysin-Vasopressin	600
Oxytocin	<0,01
Vasotocin	0,14

LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE

TESTSCHEMA

1. Lyophilisierte Reagenzien rekonstituieren und gefrorene Proben vollständig auftauen lassen. Die Reagenzien dürfen nicht auf mehr als 25 °C erwärmt werden. Röhrchen in doppelter Anordnung kennzeichnen.
2. Extraktkontrollen und unbekannte Proben gemäß Abschnitt 9.
3. Reagenzien wie folgt dispensieren:

Röhrchen/ Reagenzien	Totalaktivität	NSB	Kal 0	Kal 1-5	Kontrollen und unbekannte Proben
1% BSA-Boratpuffer	-	200 µl	200 µl	-	-
Kalibratoren (1-5)	-	-	-	200 µl	-
Extrahierte Kontrollen	-	-	-	-	200 µl
Extrahierte unbekannte Proben	-	-	-	-	200 µl
Antiserum	-	-	100 µl	100 µl	100 µl

4. Die Röhrchen mit Parafilm abdecken und vorsichtig schütteln.
5. 18–24 Stunden lang bei 2-8°C inkubieren.
6. 100 µl des Tracers in alle Wells dispensieren.
7. Abdecken und vorsichtig schütteln.
8. 18-24 Stunden bei 2-8°C inkubieren.
9. 500 µl des GAGP-PPT-Komplexes in alle Wells außer den Totalaktivität-Röhrchen dispensieren.
10. 15 bis 25 Minuten lang bei 20–25 °C inkubieren.
11. 20 Minuten lang mit 760 x g* zentrifugieren.
12. Die Überstände dekantieren.
13. Jedes Röhrchen mindestens 60 Sekunden lang in einem Gammaszintillationszähler zählen.

*g = (1118×10^{-8}) (Radius in cm) $(U/min)^2$

ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA DI VASOPRESSINA

1. Uso previsto

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*

Questo kit serve per la determinazione quantitativa di arginina vasopressina umana (AVP, ADH) nel plasma o in altri campioni mediante analisi radioimmunologica (RIA) a seguito di estrazione mediante silice ODS.

2. SOMMARIO E SPIEGAZIONI

L'arginina vasopressina (AVP) è un peptide ciclico costituito da 9 amminoacidi. La struttura di AVP è molto simile a quella dell'ossitocina, si differenzia solo in due aminoacidi. La vasopressina, per la sua potente azione antidiuretica, è nota anche come antidiuretina (ADH). L'AVP agisce principalmente sul tubulo collettore del rene, provocando un aumento di permeabilità all'acqua e all'urea, ma non a molecole più grandi. L'AVP inoltre ha funzioni neurotrasmettitrici, nonché fattori di rilascio e funzioni umorali periferiche.[1]

È noto da molti anni che l'AVP è prodotta in due punti dell'ipotalamo, il nucleo sopraottico e il nucleo paraventricolare.

L'AVP viene trasportata dal nucleo sopraottico, mediante assoni, attraverso il tratto neuroipofisario, al pituitario posteriore, dove gli assoni terminano come bottoni terminali sui capillari. È da questa regione che avviene la secrezione di AVP nella circolazione periferica, probabilmente in associazione con molecole di trasporto di proteine note come neurofisina.[2-4]

È probabile che l'AVP dal nucleo paraventricolare sia secreta nei capillari del sistema portale ipofisario/ipotalamico e inviata al pituitario anteriore dove potrebbe stimolare il rilascio di adrenocorticotropina (ACTH).

È noto che vari stimoli osmotici e non osmotici provocano il rilascio di AVP. Esiste un sistema di feedback negativo, che comprende il rene, il sistema nervoso centrale e il meccanismo della sete; questo sistema favorisce la regolazione della concentrazione dei liquidi corporei. Il rilascio di AVP è inoltre condizionato da vari altri fattori, fra cui: stress emotivo, postura, volume ematico, temperatura e molti agenti farmacologici. Sembra che l'alcool inibisca lievemente la secrezione di AVP.[5-7]

L'analisi di AVP è utilizzata negli studi che riguardano diabete insipido, sindrome di inadeguata secrezione di ADH (SIADH), sindrome di produzione di AVP ectopica e intossicazione psicogena da acqua.[5, 8]

L'analisi RIA per AVP è molto utile nella distinzione fra diabete insipido centrale da diabete insipido nefrogenico. Il diabete insipo centrale, che è contrassegnato da sete eccessiva (polidipsia) e dal passaggio di grandi quantità di urina diluita (poliuria), è causato da una inadeguata produzione di AVP. Il diabete insipido centrale può essere o di natura familiare o idiopatica e può colpire sia uomini che donne di qualsiasi età. Al contrario, il diabete insipido nefrogenico è causato dalla mancata risposta dei tubuli renali alla vasopressina, rendendo i tubuli incapaci di riassorbire l'acqua.

Il diabete insipido nefrogenico, che è ereditario, in genere colpisce gli uomini, normalmente

si presenta nell'infanzia ed è caratterizzato da livelli normali di AVP in circolo.[4, 9, 10]

SIADH si riferisce ad un rilascio di vasopressina non adeguato per una bassa osmolalità del siero.[11, 5] Può essere causata da varie condizioni, fra cui: malattie polmonari, trauma cranico (ferita o intervento chirurgico), infezione locale e tumore. Certi neoplasmi (in particolare il carcinoma broncogeno) producono AVP o peptidi AVP-simili. Questa sindrome di produzione ectopica di vasopressina è generalmente caratterizzata da un aumento decisamente elevato di livelli di AVP.[12]
L'intossicazione psicogena da acqua è causata da un consumo eccessivo e compulsivo di acqua. Non è il risultato di un disturbo fisico; piuttosto, come indica il nome, l'intossicazione psicogena da acqua è un disturbo comportamentale.

3. PRINCIPIO DELL'ANALISI

L'analisi RIA DiaSorin AVP consta di 2 procedure. La prima prevede l'estrazione dei campioni utilizzando colonne octadecisilano-silice (silice ODS) incluse nel kit. I campioni estratti vengono quindi analizzati mediante una procedura DIA di disequilibrio per aumentare la sensibilità. C'è una pre-incubazione del campione e del primo anticorpo per 18 - 24 ore a 2-8°C; viene quindi aggiunto il tracciante a cui fa seguito una seconda incubazione a 2-8°C. La separazione di fase è completa in15-25 minuti a 20-25°C con un complesso pre-precipitato di secondo anticorpo, carrier e PEG aggiunti con un'unica operazione con pipetta.

4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

Tampone BSA-borato 1% per vasopressina	1 fiala/35 mL
Calibratore per vasopressina	1 fiala/2,0 mL
Antisiero vasopressina	1 fiala/7 mL
^{125}I Vasopressina	1 fiala/7 mL
Complesso precipitante (GAGP-PPT)	1 fiala/ 35 mL
Plasma di controllo per vasopressina	2 fiale/2,5 mL
Numero di test	65

CONSERVAZIONE: Dopo il ricevimento dei reagenti e prima della ricostituzione, conservarli a 2-8°C. Dopo la ricostituzione, conservare tutti i reagenti a -15° o a una temperatura inferiore, fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. I reagenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza.

Durante la ricostituzione del contenuto delle fiale, mescolare delicatamente al fine di evitare la formazione di schiuma. Non si devono mescolare reagente di lotti diversi.

4.1 Tampone BSA-borato 1% per vasopressina 1%: reagente liofilizzato
Il tampone BSA-borato 1% contiene timerosal come conservante. Ricostituire la fiala con 35 mL di acqua purificata e lasciar riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso.

4.2 Calibratore arginina vasopressina: reagente liofilizzato

L'arginina vasopressina purificata, a concentrazione nominale di 80 pg/mL, è diluita in un tampone BSA-borato contenente timerosal. I valori esatti vengono indicati per ogni lotto.

Ricostituire la fiala con 2,0 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso. Per ottenere l'intera curva di calibrazione, fare diluizioni in serie aggiungendo 500 µL di calibratore a 500 µL di tampone BSA-borato 1% per ottenere calibratori di 40, 20, 10 e 5 pg/mL (questi valori variano in base alla concentrazione esatta del lotto del calibratore).

Aggiungere 500 µL di calibratore 80 pg/mL a 500 µL di BSA-borato 1% e mescolare per ottenere 40 pg/mL.

Aggiungere 500 µL di calibratore 40 pg/mL a 500 µL di BSA- borato 1% e mescolare per ottenere 20 pg/mL.

Aggiungere 500 µL di calibratore 20 pg/mL a 500 µL di BSA-borato 1% e mescolare per ottenere 10 pg/mL.

Aggiungere 500 µL di calibratore 10 pg/mL a 500 µL di BSA-borato 1% e mescolare per ottenere 5 pg/mL.

Il calibratore vasopressina DiaSorin è stato calibrato in base alla preparazione dell'OMS 77/501. Eventuali confronti con altri prodotti o procedure di sensibilità devono essere fatti in base a questo standard di riferimento. Il calibratore dimostra commutabilità con i campioni del paziente quando usati con reagenti e con la procedura operativa di questo test diagnostico *in vitro*, come consigliato.

4.3 Antisiero vasopressina: reagente liofilizzato

Il siero di porcellino d'India anti-vasopressina è diluito in un tampone BSA-borato contenente timerosal. Ricostituire la fiala con 7 mL di acqua purificata e lasciar riposare per 15 - 20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso.

4.4 ^{125}I Vasopressina: reagente liofilizzato

(Lys^{8}) Vasopressina è etichetta con iodio-125 e diluita in un tampone BSA-borato-EDTA contenente timerosal. Ricostituire la fiala con 7 mL di acqua purificata e lasciar riposare per 15 - 20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso.

4.5 Complesso precipitante (GAGP-PPT): reagente liofilizzato

Siero normale di porcellino d'India, pre-precipitato con siero capra anti-porcellino d'india e polietilene glicolico (PEG), è diluito in un tampone BSA-borato e aggiunta di conservanti. Ricostituire la fiala con 35 mL di acqua depurata; mescolare accuratamente fino a quando la sospensione si presenta omogenea, quindi lasciar riposare per almeno 30 minuti a temperatura ambiente mescolando occasionalmente.

4.6 Plasma di controllo vasopressina: reagente liofilizzato

Nel plasma umano si aggiunge, se necessario, una quantità necessaria di arginina

vasopressina per ottenere una concentrazione nei range specificati. La sodio azide è aggiunta come conservante. Ricostituire ogni fiala con 2,5 mL di acqua purificata e lasciar riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente e trattare il plasma per il controllo di qualità come campione non noto.

4.7 Silice ODS: reagente liofilizzato

Octadecilsilano-silice è contenuta in colonne di plastica (Sep-Paks). Le colonne silice ODS in dotazione nel kit devono essere "primed" prima dell'applicazione del campione (vedere la sezione Procedura). Le colonne possono essere conservate a temperatura ambiente.

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Non per uso interno o esterno su animali o persone.

REAGENTI CONTENENTI MATERIALE DI PROVENIENZA UMANA
Trattare come potenzialmente infettivi.

Ogni unità di siero/plasma da donatore usata nella preparazione di questo prodotto è stata testata con una metodica approvata dalla FDA statunitense e trovata non reattiva per la presenza di HBsAg, anticorpi a HCV e anticorpi ad HIV 1/2. Anche se questi metodi sono estremamente accurati, non è garantita la localizzazione di tutte le unità infette. Questo prodotto può inoltre contenere altro materiale di provenienza umana per il quale non esiste un test approvato. Poiché nessuna metodologia di test approvata può offrire garanzia completa sull'assenza del virus dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV), del virus di immunodeficienza umana (HIV) o di altri agenti infettivi, tutto il materiale di provenienza umana deve essere trattato in conformità con le buone pratiche di laboratorio adottando le precauzioni appropriate come descritto nei manuali dei Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," quarta edizione, Maggio 1999 o edizione corrente.

REAGENTI CONTENENTI SODIO AZIDE

ATTENZIONE: Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con componenti in piombo o rame e formare quindi azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, lavare con abbondante acqua al fine di evitare la formazione di azide. Per ulteriori informazioni, consultare "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," nel manuale Guide-Safety Management No. CDC-22 pubblicato dai Centri per il controllo e la Prevenzione delle malattie di Atlanta, GA, 1976.

Frasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Dannoso per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).

R32 - Contact with acids liberates very toxic gas (Il contatto con acidi libera gas altamente tossico).

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water (Dopo il contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua).

REAGENTI CONTENENTI TIMEROSAL

Alcuni reagenti di questo kit contengono timerosal in cui è presente un composto di mercurio. Lo smaltimento del mercurio allo stato di elemento, inorganico, di ossidi di mercurio e composti di mercurio deve essere effettuato in piena conformità con tutte le normative locali, statali e federali.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene un prodotto chimico noto nello Stato della California per provocare cancro.

REAGENTI CONTENENTI IODIO-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 1µCi (37kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene un prodotto chimico noto nello Stato della California per provocare cancro.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può

essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e

sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

6. INDICAZIONI DI POSSIBILE DETERIORAMENTO DEI REAGENTI DEL KIT

6.1 La presenza di particolato anomalo in uno qualsiasi dei reagenti.

6.2 Uno sfasamento nella pendenza o posizione della curva di calibrazione rispetto a quella che normalmente si ottiene.

6.3 Una diminuzione del legame massimo.

6.4 Un legame altamente non specifico.

7. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Sono richiesti due millilitri di plasma EDTA per l'estrazione.

Prelevare il sangue mediante venopuntura in una provetta di vetro da 5 o 10 mL sotto vuoto. L'EDTA (7,2 mg/5 mL di sangue) è usato come anticoagulante. Centrifugare subito per

15 minuti a 760 x g.* Separare il plasma dalle cellule e disporlo nelle provette di conservazione. La vasopressina si è dimostrata stabile a temperatura ambiente per diverse ore. Per conservazione prolungata, congelare a -15°C o a temperatura inferiore. Tutto il materiale in plastica, oggetti in vetro o altro materiale che viene a contatto con i campioni deve essere completamente esente da qualsiasi contaminazione.

NOTA: È stato osservato che si possono avere tempi inferiori di recupero quando si usano plasma o siero contenenti eparina. Inoltre, il plasma eparinizzato può saltuariamente otturare la colonna Sep-Pak.

8. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI, NON FORNITI IN DOTAZIONE

8.1 Provette in vetro borosilicato monouso, 12 x 75 mm.

8.2 Centrifuga a temperatura controllata adatta per 12 provette da 75 mm.

8.3 Contatore ad emissione di scintille gamma adatto per il conteggio di iodio-125.

8.4 Mixer Vortex.

8.5 Dispositivi per operazioni con pipetta:

- **a.** Micropipette calibrate per erogare 100 µL e 200 µL.
- **b.** Dosatori a ripetizione calibrati per erogare 100 µL e 500 µL.

8.6 Siringhe monouso da 12 mL.

8.7 Metanolo, reagente di grado o migliore.

8.8 Acido acetico al 4%.

8.9 1 M acido cloridrico.

8.10 Aria compressa o azoto.

* g = (1118 x 10^{-8}) (raggio in cm) $(rpm)^2$

8.11 Bagno di acqua a 37°C.

8.12 Provette in vetro monouso, 16 x 100 mm.

8.13 Acqua purificata

9. ESTRAZIONE DI PLASMA CON COLONNE IN SILICE ODS

9.1 Collegare ogni Sep-Pak allo stantuffo di una siringa.

9.2 Aggiungere 5 mL di azoto in ogni siringa.

9.3 Comprimere nella siringa con il pistone.

9.4 Togliere i Sep-Pak.*

9.5 Togliere il pistone dalle siringhe.

9.6 Applicare i Sep-Pak alle siringhe.

9.7 Aggiungere 10 mL di acqua purificata in ogni siringa.

9.8 Ripetere le operazioni dal punto 9.3 al punto 9.6.

9.9 Ripetere l'operazione al punto 9.7, quindi le operazioni dal punto 9.3 al punto 9.6.

9.10 Acidificare 2 mL di plasma EDTA o plasma di controllo con 200 µL di 1 M HCl (acido cloridrico). Il pH dovrà essere 3 - 4. Caricare il campione nella siringa e spingere lentamente, per un minuto, attraverso la colonna.

9.11 Ripetere le operazioni dal punto 9.4 al punto 9.6.

9.12 Risciacquare la colonna con 20 mL di acido acetico al 4%.

9.13 Ripetere le operazioni dal punto 9.3 al punto 9.6.

9.14 Raccogliere l'eluato in 16 provette da 100 mm eluendo il peptide con 3 mL di azoto. Spingere lentamente in modo che l'azoto rimanga in contatto con silice ODS per almeno 3 minuti.

9.15 Ripetere le operazioni dal punto 9.4 al punto 9.6.

9.16 Aggiungere 1 mL di azoto per garantire la completa eluizione.

9.17 Far evaporare l'eluato di metanolo fino ad asciugatura completa in un bagno di acqua a 37°C usando un getto di aria (aria compressa) o azoto. I campioni devono essere completamente asciutti. Non lasciare nel bagno di acqua a 37°C più del tempo richiesto per l'asciugatura.

9.18 Ricostituire il campione con 0,5 mL di tampone BSA-borato 1% (se si ritiene che un campione sia elevato, diluirlo in questa operazione con una quantità maggiore di BSA-borato 1%). Agitare nel Vortex e porre a 37°C per dieci minuti per garantire la ricostituzione del campione asciutto. Agitare nel Vortex dopo l'incubazione.

9.19 Analizzare due serie da 200 µL mediante analisi radioimmunologica.

* TOGLIERE IL SEP-PAK DALL'ESTREMITÀ DELLA SIRINGA PRIMA DI TOGLIERE IL PISTONE PER EVITARE DI CONTAMINARE IL CONTENUTO DELLA SIRINGA CON IL LIQUIDO CONTENUTO NEL SEP-PAK.

10. PROCEDURA DELL'ANALISI

10.1 Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciare scongelare completamente eventuali reagenti congelati. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 20-25°C. Mescolare lentamente tutti i reagenti prima dell'uso.

10.2 Preparare ed etichettare due serie di 12 provette monouso da 75 mm in base allo Schema di analisi sul retro della copertina.

10.3 Aggiungere i reagenti come indicato di seguito:

a. Provette per il conteggio totale
Lasciare da parte fino al punto 4

b. Provette per legame non specifico (NSB)
200 µL di BSA-borato 1%

c. Calibratore 0
200 µL di BSA-borato 1%
100 µL di antisiero vasopressina

d. Calibratori
200 µL di calibratore vasopressina
100 µL di antisiero vasopressina

e. Controllo estratto e campioni non noti
200 µL di estratto
100 µL antisiero vasopressina

10.4 Agitare lentamente le provette nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 18-24 ore a 2-8°C.

10.5 Aggiungere 100 µL di ^{125}I vasopressina in tutte le provette.

10.6 Agitare lentamente le provette nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 18-24 ore a 2-8°C.

10.7 Mescolare vigorosamente il complesso GAGP-PPT ed aggiungere 500 µL in tutte le provette, eccetto le provette per il conteggio totale.

10.8 Agitare lentamente le provette nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 15-25 minuti a 20-25°C.

10.9 Centrifugare le provette per 20 minuti a 760 x g* a 20-25°C.

10.10 Far decantare immediatamente i liquidi superficiali da tutte le provette, eccetto le

provette per il conteggio totale, capovolgendole per un periodo minimo di due minuti. Asciugare le provette con carta assorbente per eliminare eventuali gocce di liquidi superficiali che possono essere rimaste sulle provette prima di riportarle in posizione verticale.

- $g = (1118 \times 10^{-8})$ (raggio in cm) $(rpm)^2$

10.11 Usando un contatore ad emissione di scintille gamma, contare il precipitato di ogni provetta e delle provette per il conteggio totale per un tempo sufficiente a raggiungere la precisione statistica (vedere la sezione Limiti della procedura).

11. COMMENTI SULLA PROCEDURA

11.1 Analizzare tutti i campioni in duplice serie per garantire l'affidabilità dei valori ottenuti.

11.2 Aggiungere ogni aliquota di reagente al terzo inferiore della provetta di analisi al fine di garantire una miscela completa di reagenti.

11.3 Alcune provette monouso determinano legami aspecifici elevati.

11.4 Se si decide di aspirare il liquido superficiale dal precipitato, fare attenzione a non smuovere quest'ultimo.

11.5 Per un monitoraggio completo della costanza di performance di un'analisi RIA, si possono controllare altri fattori. DiaSorin consiglia di controllare i seguenti parametri per garantire prestazioni costanti del kit:

a. Conteggi totali

b. Legame massimo

Conteggi medi al minuto (CPM) delle provette del calibratore 0/CPM medio delle provette per il conteggio totale.

c. Legame non specifico

CPM medio della provetta NSB/CPM medio delle provette per il conteggio totale.

d. Pendenza della curva di calibrazione

Ad esempio, monitorare i punti di soppressione a 80, 50 e 20% della linea del calibratore.

12. CONTROLLO DI QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe includere almeno due controlli in ogni analisi per garantire la validità dei risultati di ogni analisi. Determinare quindi la deviazione media e standard per ogni controllo usando un minimo di dieci analisi. Si può quindi ottenere un range

accettabile di valori per questi controlli utilizzando ±2 deviazioni standard dei valori determinati in precedenza. Il Laboratorio di Controllo della Qualità DiaSorin ha stabilito un range per i controlli inclusi nel kit. I range sono stampati sulle etichette delle fiale.

13. CALCOLO DEI RISULTATI

Esistono molti metodi per calcolare i risultati di RIA, ognuno tende ad ottenere una curva di calibrazione mediante tracciamento dell'estensione del legame rispetto alle concentrazioni indicate dei calibratori. Il grafico può essere su scala lineare o logaritmica. Ciascun metodo dà essenzialmente gli stessi valori per i controlli e i campioni, anche se certe analisi possono essere più "adatte" per un particolare metodo rispetto ad un altro. Il metodo di calcolo del Laboratorio di controllo qualità di DiaSorin è % di B/B_0 rispetto alla concentrazione di log.

13.1 Calcolare il CPM medio per ogni calibratore, controllo e campione non noto.

13.2 Sottrarre il CPM medio delle provette NSB da tutti i conteggi.

13.3 Dividere il CPM corretto di ogni calibratore, controllo o campione non noto per il CPM corretto del calibratore 0.

$$B/B_0\ (\%) = \frac{\text{CPM del calibratore o campione non noto - CPM di NSB}}{\text{CPM del calibratore 0 - CPM di NSB}} \times 100$$

13.4 Utilizzando carta millimetrata per modello log-logit o semi-logaritmica a due cicli, tracciare la percentuale di B/B_0 per i calibratori della vasopressina (asse verticale) rispetto alla concentrazione (asse orizzontale).

13.5 Tracciare una linea di migliore interpolazione fra i punti.

13.6 Interpolare i livelli di vasopressina nei campioni non noti.

13.7 Calcolare il valore di vasopressina. Ad esempio: se sono stati estratti 2 mL di plasma e ricostituiti a 0,5 mL, dividere per quattro; se sono stati estratti 2 mL di plasma e ricostituirli a 1,0 mL, dividere per due.

13.8 Se un campione dà una lettura maggiore rispetto al calibratore superiore, si deve eseguire nuovamente l'estrazione del campione con un volume inferiore di plasma e/o ricostituire il campione con un volume superiore di BSA-borato 1%.

13.9 Se dovesse rimanere dell'estratto, potrà essere diluito e analizzato nuovamente.

13.10 Calcolare il legame massimo dividendo il CPM del calibratore 0 per la media dei conteggi totali ottenuta nelle provette dei conteggi totali.

TABELLA II
Dati campione DiaSorin Vasopressina RIA

Provetta	CPM in duplicato	CPM medio	CPM corretto	Percentuale legame (B/T)	Percentuale (B/B_0)	Conc. Graf. (pg/mL)	Conc. finale (pg/mL)
Conteggio tot.	5.841	5.917					
	5.992						
NSB	192	199		3,4			
	205						
Calibratore 0	2.970	2.872	2.673	48,5	100		
	2.774						
Calibratori (pg/mL)							
A(5)	2.537	2.566	2.367		88,6		
	2.595						
B(10)	2.374	2.324	2.125		79,5		
	2.274						
C(20)	1.772	1.779	1.580		59,1		
	1.785						
D(40)	1.200	1.234	1.035		38,7		
	1.268						
E(80)	819	819	620		23,2		
	818						
Campioni non noti							
1	2.591	2.556	2.357		88,2	5,5	1,4
		2.521					
2	1.265	1.297	1.098		41,1	36,5	9,1
	1.329						

La TABELLA II e la FIGURA 1 riportano dati di campioni tipici; queste informazioni servono solo a scopo di riferimento e non devono essere usate per il calcolo dei valori.

ESEMPIO DI CURVA DI CALIBRAZIONE PER VASOPRESSINA

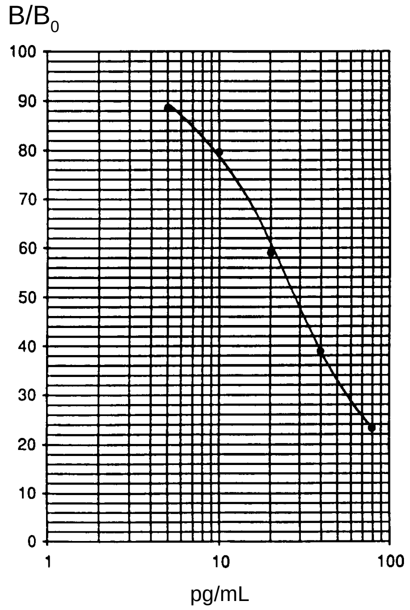


FIGURA 1

Riduzione dei dati

Il Laboratorio di controllo di qualità DiaSorin utilizza una retta curvilinea uniforme.

14. LIMITI DELLA PROCEDURA

14.1 Fare attenzione ad estrarre uniformemente tutti i campioni.

14.2 Il conteggio delle volte dovrebbe essere sufficiente per prevenire l'introduzione di errori statistici nel conteggio (ad esempio, l'accumulo di 2.000 CPM produrrà un errore del 5%; 10.000 CPM produrrà un errore dell'1%).

15. VALORI PREVISTI

Range Normale

Ogni laboratorio deve stabilire un range di riferimento proprio. In campioni di uomini e donne (n = 27), DiaSorin ha stabilito che il valore medio di vasopressina è di 1.4 pg/mL, con un range normale di ND-4.7 pg/mL. I valori normali sono stati calcolati mediante estrazione di 2 mL di plasma EDTA. Le risposte finali sono state divise per quattro dando il range normale di NR-4.7 pg/mL. La fase di estrazione e di concentrazione consente di riportare valori che diversamente sarebbero inferiori alla sensibilità dell'analisi.

I valori ottenuti da DiaSorin sono conformi con quelli ottenuti da altri ricercatori. In uno studio in cui sono stati utilizzati 31 soggetti normali, il range normale di vasopressina nel plasma è stato stabilito essere 1.4 ±1.0 pg/mL.[1]

16. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PERFORMANCE

16.1 PRECISIONE

Variazione intra-analisi (valori = pg/mL)

Numero campione	Valore medio	D.S.	(% C.V.)
BASSO	4,9	0,54	11,2
MEDIO	22,7	1,38	6,1
ALTO	41,5	2,25	5,4

Variazione intra-analisi (valori = pg/mL)

Numero campione	Valore medio	D.S.	(% C.V.)
BASSO	5,0	0,14	2,8
ALTO	40	1,78	4,4

16.2 Accuratezza: l'accuratezza dell'analisi è stata verificata mediante test di diluizione e test di recupero.

LINEARITÀ (PARALLELISMO)

STUDIO DI DILUIZIONE SERIALE DI TRE CAMPIONI (VALORI = PG/ML)

Numero campione	Non diluito	1/2	1/4
1	5,4	5,5	4,7
2	9,3	8,9	9,0
3	3,5	3,1	2,8

RECUPERO (ATTENDIBILITÀ) (VALUES = PG/ML)

Valore di fondo	Calibratore aggiunto	Valore previsto	Valore misurato	Percentuale di recupero
Set N. 1				
2,2	3,0	5,2	4,8	92
2,2	5,0	7,2	6,3	88
2,2	10	12,2	11	90
Set N. 2				
1,9	3,0	4,9	5,0	102
1,9	10	11,9	10,1	85
1,9	20	21,9	20,3	93

16.3 Sensibilità Analitica

La quantità minima rilevabile, se definita come concentrazione apparente a tre deviazioni standard dai conteggi a legame massimo, è di 2,5 pg/mL. Se un campione dà una lettura inferiore a 2,5 pg/mL prima della correzione del fattore di diluizione, questo non può essere distinto da zero.

16.4 Specificità Analitica

Il confronto della reattività dell'anticorpo vasopressina è stato eseguito con i seguenti peptidi:

Peptide	% di reattività incrociata
Arginina vasopressina	100
Lisina vasopressina	600
Ossitocina	<0,01
Vasotocina	0,14

FARE RIFERIMENTO ALL'ULTIMA PAGINA PER LA BIBLIOGRAFIA

Schema di analisi

1. Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciar scongelare completamente eventuali campioni congelati. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 25°C. Contrassegnare due serie di provette.
2. Estrarre i controlli e i campioni non noti in base alle istruzioni nella Sezione 9.
3. Versare il reagente seguendo lo schema seguente:

Provette/Reagenti	Conteg-gi totali	NSB	CAL 0	CAL 1-5	Controlli e campioni non noti
Tampone BSA-borato 1%	-	200 µL	200 µL	-	-
Calibratori (1-5)	-	-	-	200 µL	-
Controlli estratti	-	-	-	-	200 µL
Campioni non noti estratti	-	-	-	-	200 µL
Antisiero	-	-	100 µL	100 µL	100 µL

4. Coprire le provette con pellicola e agitare lentamente nel Vortex.
5. Lasciare in incubazione per 18-24 ore a 2-8°C.
6. Versare 100 µL di tracciante in tutti i pozzetti.
7. Coprire e agitare lentamente nel Vortex.
8. Lasciare in incubazione per 18-24 a 2-8°C.
9. Versare 500 µL del complesso GAGP-PPT in tutti i pozzetti, eccetto le provette per il conteggio totale.
10. Lasciare in incubazione per 15-25 minuti a 20-25°C.
11. Centrifugare a 760 x g* per 20 minuti.
12. Far decantare i liquidi superficiali.
13. Contare ogni provetta in un contatore a raggi gamma per 60 secondi o più.

*g = (1118 x 10^{-8}) (raggio in cm) $(rpm)^2$

REFERENCES/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFIA

1. Cowley, A.W. Jr., W.C. Cushamn, E.W. Quillen, Jr., M.M. Skelton and H.G. Langford, “Vasopressin Elevation in Essential Hypertension and Increased Responsiveness to Sodium Intake,” **Hypertension,** 3:93, (1981).

2. Clark, G., P. Wood, L. Merrick and D.W. Lincoln, “Opiate Inhibition of Peptide Release from the Neurohumoral Terminals of Hypothalamic Neurones,” **Nature,** 282:746, (1979).

3. Malvin, R.L., “Possible Role of the Renin-angiotensin System in the Regulation of Antidiuretic Hormone Secretion,” **Federation Proceedings (Am. Physiological Soc.),** 30:1383, (1971).

4. Pullan, P.T., B.H. Clappison and C.I. Johnston, “Plasma Vasopressin and Human Neurophysins in Physiological and Pathological States Associated with Changes in Vasopressin Secretion,” **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,** 49:580, (1979).

5. Lester, M.C. and P.B. Nelson, “Neurological Aspects of Vasopressin Release and the Syndrome of Inappropriate Secretion of Antidiuretic Hormone,” **Neurosurgery,** 8:735, (1981).

6. Schrier, R.W. and J.P. Goldberg, “The Physiology of Vasopressin Release and the Pathogenesis of Impaired Water Excretion in Adrenal, Thyroid, and Edematous Dis- orders,” **The Yale Journal of Biology and Medicine,** 53:525, (1980).

7. Weitzman, R.E., L. Farnsworth, R. MacPhee, C.C. Wang and C.M. Bennett, “Effect of Opposing Osmolar and Volume Factors on Plasma Arginine Vasopressin in Man,” **Mineral and Electrolyte Metabolism,** 1:43, (1978).

8. Shimizu, K. and M. Hoshino, “Application of Vasopressin Radioimmunoassay to Clinical Study: Role of Vasopressin Hyponatremia and Hypernatremia and Some Other Dis-orders of Water Metabolism,” **Contr. Nephrology,** 9:42, (1978).

9. Baylis, P.H. and G.L. Robertson, “Case Reports: Vasopressin Function in Familial Cranial Diabetes Insipidus,” **Postgraduate Medical Journal,** 57:36, (1981).

10. Block, L.H., J. Furrer, R.A. Locher, W. Siegenthaler and W. Vetter, “Changes in Tissue Sensitivity to Vasopressin in Hereditary Hypothalamic Diabetes Insipidus,” **Klinishe Wochenschrift,** 59:831, (1981).

11. Haas, M., and S.M. Glick, “Radioimmunoassayable Plasma Vasopressin Associated with Surgery,” **Archives of Surgery,** 113:597, (1978).

12. Yamaji, T., M. Ishibashi and S. Katayama, “Nature of the Immunoreactive Neurophysins in Ectopic Vasopressin-producing Oat Cell Carcinomas of the Lung,” **Journal of Clinical Investigation,** 68:388, (1981).

13. Preibisz, J.J., J.E. Sealy, J.H. Laragh, R.J. Cody and B.B. Weksler, “Plasma and Platelet Vasopressin in Essential Hypertension and Congestive Heart Failure,” Supplement I, **Hypertension,** I:129, (1983).

Symbols used with devices

Symbol	English	Français	Deutsch	Italiano
CE	European Conformity	Conformité aux normes européennes	CE – Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea
	Expiration Date	Date limite d'utilisation	Mindesthaltbar-keitsdatum	Data di scadenza
	Manufacturer	Fabricant	Hersteller	Fabbricante
	Consult Instructions for Use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanwei-sung beachten	Consultare le istruzioni per l'uso
IVD	In vitro diagnostic.	Diagnostic in vitro.	In-vitro-Diagnostikum.	Diagnostica in vitro.
LOT	Lot No.	No. de lot	Chargen-Nr.	Lotto n°
	Temperature limitation.	Limitation de température.	Temperaturbereich	Limite della temperatura
Ab	Antiserum	Antisérum	Antiserum	Antisiero
Ab PEG	Precipitating reagent	Réactif précipitant	Fällungsreagenz	Reagente precipitante
Ag ^{125}I	Tracer: antigen labelled with ^{125}I	Traceur : antigène marqué à l'iode ^{125}	Tracer: ^{125}I-markiertes Antigen	Tracciatore: antigene etichettato con ^{125}I
BUF	Buffer	Tampon	Puffer	Tampone
CAL	Calibrator	Étalon	Kalibrator	Calibratore
CONTROL	Control serum	Sérum de contrôle	Kontrollserum	Siero di controllo
	Radioactive	Radioactif	Radioaktiv	Radioattivo
	Harmful	Nocif	Gesundheits-schädlich	Nocivo

Distribué Par :

DiaSorin S.A.
11, rue Georges Besse
92160 Antony, France

DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.

Phone: 651-439-9710
FAX: 651-779-7847

For Customer Service in the
U.S. and Canada Call Toll Free:
800-328-1482

In the United Kingdom Call:
44 118 9364200
FAX: 44 118 9792061

27334
10397 9/03

PRINTED IN U.S.A.